

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Anotación del genoma de una cepa nativa de
Acidithiobacillus ferrivorans psicrotolerante y genómica
comparativa de genes relacionados a la tolerancia al
frío**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Robert Jose Ccorahua Santo

ASESOR

Pablo Sergio Ramírez Roca

Lima - Perú

2015

*“Gestiona tu lucha y tu éxito de tal manera
que lo que más admiren de ti, sea tu humildad”*

Anónimo

Esta tesis es producto del proyecto FINCyT titulado como **“BIOLIXIVIACIÓN DE MINERALES POR MICROORGANISMOS ACIDÓFILOS PSICROTOLERANTES AISLADOS DE ZONAS MINERAS ALTOANDINAS DEL PERÚ PARA SU APLICACIÓN EN PROCESOS INDUSTRIALES”** con **Contrato-188-IB-FINCyT-2013** y como Coordinador General e Investigador Principal al Doctor Pablo Sergio Ramírez Roca.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, sin excepción de nadie. Que siempre los llevo en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi asesor de tesis PhD. Pablo Ramírez, porque me permitió trabajar en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, por sus palabras, por sus críticas y por sus enseñanzas que hicieron que me desarrolle como in investigador.

Además, quiero agradecer al PhD. Michel Abanto por instruirme en algunas técnicas de genómica comparativa.

Por otro lado, a la profesora Mg. Ruth García, por darme ánimos a no dejar de trabajar.

Por último quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio, de todos he aprendido un poco.

INDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Base teórica	4
2.2.1. Biolixiviación bacteriana	4
2.2.2. Biolixiviación bacteriana por <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	4
a) Fundamentos de biolixiviación en <i>At. ferrivorans</i>	5
b) Mecanismos moleculares de <i>At. ferrooxidans</i> para la biolixiviación.	6
c) Transporte de electrones desde el Cyc2.	6
d) Regulación génica de <i>At. ferrivorans</i> para la biolixiviación.	8
e) Genes de tolerancia al frío en la bacteria psicotolerante <i>At. ferrivorans</i>	9
2.2.3. Propiedades de la trehalosa	10
2.2.4. Secuenciamiento por Illumina Hiseq	12
a) Flujo de trabajo en plataforma de IlluminaTM	12
b) Preparación de librería genómica	13
b.1) Preparación acelerada de muestra	13
b.2) Preparación química de muestra: TruSeq ADN libre de PCR	14
2.2.5. Herramientas bioinformáticas para Genómica Comparativa	16
a) MultiParanoid	16
b) IslandViewer	16
c) BRIG	16
d) GCview	17
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3.1. Hipótesis	18
3.2. Objetivos	18
3.2.1. Objetivo general	18
3.2.2. Objetivos específicos	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Aislamiento de cepas bacterianas	19
4.2. Evaluación de capacidad oxidativa de cepas de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	19

4.3. Identificación de cepas	20
4.4. Secuenciamiento total del genoma de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	20
4.5. Ensamblaje y anotación del genoma de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	21
4.6. Identificación de genes ortólogos y únicos en el genoma de PQ33	22
4.7. Identificación de islas genómicas	22
4.8. Flexibilidad comparativa de proteínas	23
V. RESULTADOS	24
5.1. Caracterización fisiológica de cepas de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	24
5.2. Oxidación bacteriana de sulfuro de cobre a bajas temperaturas	26
5.3. Biopelícula en cultivos con CuS	28
5.4. Identificación de especie por 16S rRNA	28
5.5. Oxidación de hierro ferroso de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	29
5.6. Análisis del genoma de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	30
5.7. Genómica comparativa de cepas de <i>Acidithiobacillus</i>	33
5.8. Plasticidad del genoma de <i>At. ferrivorans</i>	36
5.9. Flexibilidad comparativa <i>in silico</i> de proteínas de membrana	39
VI. DISCUSIÓN	41
6.1. Oxidación de Fe ²⁺ y CuS a 5°C	41
6.2. Genes implicados en la tolerancia al frío	43
6.3. Rusticianina en una Isla Genómica	44
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
IX. ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. Modelo oxidativo de hierro ferroso en <i>At. ferrooxidans</i>	7
Figura 02. Vías biosintéticas de la trehalosa en microorganismos.	11
Figura 03. Flujo de trabajo para secuenciamiento por Illumina™.	13
Figura 04. Preparación de librería química para secuenciamiento por Illumina™.	15
Figura 05. Cultivo en placa en medio sólido con agarosa, de un consorcio de Pasco, Perú.	24
Figura 06. Curva de crecimiento de doce cepas de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	25
Figura 07. Curva de crecimiento de <i>Acidithiobacillus</i> PQ33 utilizando sulfuro de cobre al 0.5%. ...	26
Figura 08. Cultivos de cepas de <i>At. ferrivorans</i> PQ33 y <i>At. ferrooxidans</i> PQ506 en Medio Base con sulfuro de cobre al 0.5 %.	27
Figura 09. Presencia de biopelícula en cultivo de medio base más CuS al 0.5%.	28
Figura 10. Alineamiento de secuencias del gen ribosomal RNA 16S de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	29
Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa <i>At. ferrivorans</i> PQ33 en medio 9K con hierro ferroso como donante de electrones a una temperatura de 5°C pH 1.6 y pH 2.0, y a una temperatura de 24°C, pH 1.6 y pH 2.0.	30
Figura 12. Alineamiento circular de genomas de <i>At. ferrooxidans</i> 23270, <i>At. ferrooxidans</i> 53993 y <i>At. ferrivorans</i> PQ33 utilizando el genoma de <i>At. ferrivorans</i> SS3 como referencia base.	32
Figura 13. Análisis comparativo de las regiones flaqueantes en el operón de trehalosa utilizando como referencia el genoma de <i>At. ferrivorans</i> SS3.	35
Figura 14. Grado de conservación de genes de la IG-I de <i>At. ferrivorans</i> PQ33 contra los genomas de <i>At. ferrooxidans</i> 53993, <i>At. ferrooxidans</i> 23270, <i>At. ferrivorans</i> SS3 y <i>At. ferrivorans</i> CF27.	37

Figura 15. Alineamiento del operón <i>rus</i> de <i>At. ferrooxidans</i> 23270, <i>At. ferrooxidans</i> 53993, <i>At. ferrivorans</i> PQ33 y <i>At. ferrivorans</i> PQ33.	38
Figura 16. Flexibilidad de proteínas Rus de los operones <i>rus</i> de <i>At. ferrooxidans</i> 23270, <i>At. ferrivorans</i> PQ33 y de la IG-I de PQ33.	39
Figura 17. Diagrama hipotético de las vías <i>uphill</i> y <i>downhill</i> de <i>At. ferrooxidans</i> y <i>At. ferrivorans</i>	46
Figura S1. Integridad del DNA de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	58
Figura S2. Calidad de la librería genómica de <i>At. ferrivorans</i> PQ33.	59
Figura S3. Longitud acumulativa de contigs de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	60
Figura S4. Cantidad de Guanina y Citosina (GC) en el genoma de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	60
Figura S5. Flexibilidad comparativa de la enzima sulfuro quinona reductasa de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01. Caracteres taxonómicos de especies de <i>Acidithiobacillus</i> sp.	5
Tabla 02. Caracterización fisiológica de cepas de <i>Acidithiobacillus</i> sp. en diferentes sustratos y a temperaturas de 25°C, 10°C y 5°C.	25
Tabla 03. Parámetros y estadísticos del ensamblaje del genoma de <i>At. ferrivorans</i> PQ33	31
Tabla 04. Comparación de las características del genoma de <i>At. ferrivorans</i> PQ33 con los genomas de <i>At. ferrivorans</i> SS3 y CF27, y <i>At. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993.	31
Tabla S1. Números de accesoión de cepas de <i>Acidithiobacillus</i> sp. que fueron caracterizadas fisiológica y molecularmente en esta investigación.	59

RESUMEN

Los procesos microbianos en la oxidación de hierro ferroso y sulfuros se utilizan en hidrometalurgia para la recuperación de metales a partir de minerales. Las bacterias psicrotolerante *Acidithiobacillus ferrivorans* realiza el proceso con mayor eficiencia que la mesófila *At. ferrooxidans* a bajas temperaturas, por lo que es importante caracterizarlas fisiológica y molecularmente. En esta investigación se aplica la genómica comparativa para hallar las principales diferencias entre un nuevo genoma nativo de *At. ferrivorans* y *At. ferrooxidans*, con el fin de descubrir los genes de tolerancia al frío. Para cumplir el objetivo, una cepa de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 se aisló de Cerro de Pasco (4261 msnm) y se cultivó en medio base 9K con sulfuro de cobre 0,5% (w/v) hasta llegar a una densidad de 5×10^8 células/ml a una temperatura de 5°C. La cinética de crecimiento se analizó en hierro ferroso y en sulfuro cobre a través de recuento en cámara de Petroff-Housser y la cuantificación de cobre (II) liberado se determinó mediante absorción atómica. Por otro lado, se secuenció el genoma de la cepa nativa de *At. ferrivorans* PQ33 con HiSeq Illumina. Los *reads* fueron ensamblados con SPAdes y los contigs fueron alineados y extendidos con el genoma de referencia *At. ferrivorans* SS3 usando los *software* ABACAS e IMAGEN. La revisión de la calidad final y la anotación del genoma se realizaron con Quast y Prokka respectivamente. La identificación de islas genómicas fue verificada con IslandViewer por la presencia de genes de movilidad y desvío de GC. La cepa se identificó a través de secuenciación de RNA ribosomal 16S y se determinó el 100% de similitud con secuencias de *At. ferrivorans* SS3 y ACH ya reportadas. Se observó un tiempo de duplicación de $66,6 \pm 5,1$ h en hierro ferroso a pH 1.6. Por otra parte, después de 30 días de evaluación, la cepa de *At. ferrivorans* PQ33 mostró un tiempo de duplicación de $63,6 \pm 3,9$ h en sulfuro de cobre y se cuantificó 1780 ± 32 mg/l de cobre liberado (II). En cuanto al genoma, este presentó 3298172 pb en 101 contigs y 56,5% de GC. La anotación del genoma evidenció 3347 genes que codifican proteínas, 47 de ARNt y 3 ARNr. En contraste con las cepas 23270 y 53993 de *At. ferrooxidans*, el genoma de *At. ferrivorans* PQ33 mostró 2 Islas Genómicas (IGs), donde una de ellas mostró proteínas con dominio pilT, y un gen de

rusticianina. Por otro lado, la proteína Rus de la IG mostró mayor flexibilidad que la de los operones *rus*. Adicionalmente, a diferencia del cepas SS3 y CF27 de *At. ferrivorans*, PQ33 mostró un gen que codifica un sistema ATPasa de salida de protones que ofrecería resistencia adicional al pH ácido. En conclusión, *At. ferrivorans* PQ33 oxida sulfuro de cobre a baja temperatura y oxida hierro ferroso a pH de 1.6. Además, *At. ferrivorans* PQ33 mostró plasticidad genómica al presentar dos IGs, donde una contiene un gen adicional *rus* que elucida posible mejora en el *fitness* evolutivo psicrotolerante de *At. ferrivorans*. Estos resultados tienen un significado importante para el desarrollo de la biolixiviación a gran altura, como en los Andes peruanos

Palabras clave: *Acidithiobacillus ferrivorans*, rusticianina, trehalosa, hierro ferroso, psicrotolerante.

ABSTRACT

Microbial processes in oxidation of ferrous iron and sulfides are used for hydrometallurgy to recovery of metals from ores. Psychrotolerant bacteria *Acidithiobacillus ferrivorans* perform the process with more performance than mesophilic *At. ferrooxidans* at low temperatures, therefore is important to characterize physiologically and molecularly the bacteria, and identify cold tolerance genes. We approach comparative genomics to find principal differences between the genome of *At. ferrivorans* and *At. ferrooxidans* in order to discover genes of cold tolerance. A strain of *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 was isolated from Cerro de Pasco (4261 m.a.s.l.) and grown in base medium 9K with copper sulfide 0.5% (w/v) reaching a density of 5×10^8 cell/ml in a 5°C temperature. For the purpose of complying with the objective, we sequenced the genome of native *At. ferrivorans* PQ33 (4261 m.a.s.l. Pasco, Peru) with HiSeq Illumina. Then, the genome assembly was done with SPAdes and the contigs were aligned and extended using the reference genome *At. ferrivorans* SS3 with the ABACAS and IMAGE software. The final quality and the annotation of the genome were performed with Quast and Prokka respectively. Genomic islands identification with IslandViewer used GC skew and mobility genes. The strain was identified through sequencing of 16S ribosomal RNA and was determined a 100% sequence similarity with sequences of *At. ferrivorans* SS3, ACH and CF27 already reported previously. The growth kinetics were analyzed in iron ferrous and copper sulfide through the counting in Petroff-Housser chamber, and the quantification of released copper (II) was determined by atomic absorption. A doubling time of 66.6 ± 5.1 hours was observed in iron ferrous at 1.6 pH. In other hand, after 15 days of evaluation, the strain of *At. ferrivorans* PQ33 showed a doubling time of 63.6 ± 3.9 hours in sulfide copper in 9K medium without iron ferrous, and 1780 ± 32 mg/L of released copper (II) was quantified. On other hand, the genome showed 3298172 bp in 101 contigs and 56.5% of GC. The genome annotation evidenced 3347 coding genes, 47 tRNA and 3 rRNA. In contrast with strains 23270 and 53993 of *At. ferrooxidans*, the genome of *At. ferrivorans* PQ33 showed 2 Genomic Islands (GIs), where one contained a pilT and rusticyanin (*rus*) genes. Rus protein from GI showed better flexibility of Rus than

from operons. In other hand, unlike the *At. ferrivorans* SS3 and CF27 strains, PQ33 showed one proton-efflux ATPase gene else which offer acidic resistance. In conclusion, *At. ferrivorans* PQ33 oxidized copper sulfide and ferrous iron at low temperature. Further, *At. ferrivorans* PQ33 display genomic plasticity with two genomic islands and one contain *rus* gene which elucidate possible improvement in the evolutionary psychrotolerant fitness of *At. ferrivorans*. These results have important meaning by development bioleaching at high altitudes like in Peruvian Andes.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrivorans*, rusticyanin, trehalose, ferrous iron, psychrotolerant.

I. INTRODUCCIÓN

La demanda de cobre está creciendo y la industria minera es requerida para procesar menas de baja ley, que suelen ser consideradas como desperdicio. El cobre metálico juega un rol importante en la economía del Perú según el Atlas de Complejidad Económica del Instituto Tecnológico de Massachusetts (Hausmann *et al.*, 2011). Dentro de los cinco productos más exportados por el Perú se encuentran el mineral de cobre (18%) y el cobre refinado (4.2 %), y entre los minerales de cobre, el más abundante es la covelita o sulfuro de cobre.

Los procesos microbianos de la oxidación del sulfuro de cobre (CuS) son los mayormente usados en hidrometalurgia para la recuperación de metales a partir de menas (Olson *et al.*, 2003). Muchos factores influyen en el proceso de biolixiviación y en su eficiencia, entre ellos, la temperatura del cultivo y la adhesión de células bacterianas a superficies de sulfuro metálico, son algunos de los más importantes. La adsorción temprana y el comportamiento de colonización de la bacteria en los minerales son importantes para la eficiencia de lixiviación de los minerales (Tan y Chen, 2012). Con respecto a la lixiviación bacteriana del sulfuro de cobre, este es un proceso complejo; otros factores como los nutrientes necesarios, el oxígeno, la densidad del inóculo y el tiempo de resistencia afectan la extracción de cobre, y las mejores condiciones necesitan ser determinadas (Cameron *et al.*, 2010). La biolixiviación de concentrados de cobre con bacterias mesófilas y termófilas se ha investigado (Gericke *et al.*, 2001), sin embargo, no se ha reportado estudios sobre biolixiviación de CuS a bajas temperaturas.

Acidithiobacillus ferrivorans puede crecer a bajas temperaturas y realizar el proceso de biolixiviación con una mayor eficiencia que *At. ferrooxidans* en las mismas condiciones (Hallberg *et al.*, 2009; Kupka *et al.*, 2007; Escobar *et al.*, 2010). Las primeras evaluaciones sobre oxidación de hierro ferroso a bajas temperaturas por parte de *At. ferrooxidans* fueron llevadas a cabo por Berthelot *et al.* (1993) y Leduc *et al.* (1993), donde obtuvieron tiempos de duplicación mayores a las 100 horas. Posteriormente Kupka *et al.* (2007) caracterizaron

una nueva cepa de *At. ferrooxidans* SS3 que podía crecer oxidando hierro ferroso a tiempos de duplicación menores a 50 horas a la temperatura de 5°C. Luego, Hallberg *et al.* (2009), estudiando la filogenia del RNA ribosomal 16S de esta nueva bacteria, la renombraron como *At. ferrivorans* SS3; este hecho reagrupó a un conjunto de bacterias que podían crecer oxidando el hierro ferroso y compuestos inorgánicos sulfurados a bajas temperaturas (~5°C) (Barahona *et al.*, 2014). Sin embargo, entre las cepas que más se han estudiado, *At. ferrivorans* SS3 (Lilivqst *et al.*, 2011) y CF27 (Talla *et al.*, 2013), no se ha reportado el crecimiento a pH menor a 1.9, aunque la cepa ACH, recientemente aislada en Chile, mostró un crecimiento a pH 1.7 (Barahona *et al.*, 2014). Esta incapacidad de no poder crecer a un pH de 1.5 en hierro ferroso, en donde ya no se forma jarosita, compuesto tóxico para *At. ferrivorans*, imposibilita el uso de la bacteria en procesos de biolixiviación de gran rendimiento (Daoud *et al.*, 2006). Por otro lado, aún no se ha reportado la oxidación de CuS a bajas temperaturas por parte de *At. ferrivorans*.

Con respecto al estudio genómico de *At. ferrivorans*, se han reportado los genes involucrados en la oxidación de hierro (Liljeqvist *et al.*, 2013), un sistema parecido al existente en *At. ferrooxidans*, principalmente el operón *rus*, con la diferencia de que *At. ferrivorans* posee dos tipos de rusticianina en lugar de uno y actualmente se desconoce la función de la segunda rusticianina. Además, estudios genómicos relacionados a la tolerancia al frío de esta bacteria han reportado un conjunto de 4 genes involucrados en la síntesis de trehalosa, que prevendría la formación de cristales en el citoplasma (Liljeqvist *et al.*, 2012; Rudolph *et al.*, 1986). Por otro lado, Liljeqvist *et al.* (2015) encontraron genes de desaturación de ácidos grasos que son conservados en bacterias con el perfil genómico parecido a *At. ferrivorans* y en otras bacterias que crecen a bajas temperaturas en relaves de minas. Entre otros genes que se relacionan a la tolerancia al frío, aún no se ha reportado el mecanismo que seguiría la bacteria *At. ferrivorans* para oxidar hierro ferroso o compuestos inorgánicos azufrados a bajas temperaturas.

En el presente estudio, se realizó la evaluación de perfil de oxidación de hierro ferroso y sulfuro de cobre a bajas temperaturas de 12 cepas de *Acidithiobacillus sp.* y la cepa con mejor perfil fue caracterizada fisiológica y molecularmente. Además, se secuenció y anotó el genoma de la cepa con mejor actividad biolixiviante. Asimismo, el estudio del operón *rus* y el subsecuente análisis de flexibilidad comparativa de proteínas de rusticianina permiten proponer un sistema que utiliza *At. ferrivorans* para realizar el proceso de biolixiviación a bajas temperaturas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Los estudios sobre genómica comparativa en microorganismos biolixiviantes del género *Acidithiobacillus* se iniciaron con Valdéz *et al.* (2008), quienes realizaron la comparación de especies estrechamente relacionadas como *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* y *At. caldus*. Ellos identificaron conjuntos de genes que podrían ser responsables de las diferencias en la oxidación del hierro y azufre en estos organismos. También sugirieron que el nitrógeno fijado puede sólo puede ser suministrado por *At. ferrooxidans*, lo que sugiere que es el principal contribuyente de nitrógeno en un consorcio de las tres bacterias como las que pueden encontrarse en un cúmulo de biolixiviación. Adicionalmente, el genoma de la cepa tipo de *At. ferrooxidans* no codifica flagelos mientras que los otros dos *Acidithiobacillus* sí poseen estas capacidades.

Recientemente, Liljeqvist *et al.* (2015) realizaron una comparación genómica a nivel metagenómico en una comunidad microbiana de relave de mina en Suecia que se encontraba por debajo de 10°C y revelaron varios genes implicados en la tolerancia al frío utilizando el genoma de *At. ferrivorans* SS3 como referencia.

2.2. BASE TEÓRICA

2.2.1. Biolixiviación bacteriana

En términos simples, y para propósito del entendimiento global de esta investigación, se define biolixiviación como “*el uso de microorganismos para lixiviación o disolución de metales a partir de una materia prima*”. Esta puede ser un mineral que contiene un metal o algún metal reciclable.

Existen numerosas aplicaciones sobre biolixiviación, principalmente en biorremediación y en industria minera. El objetivo de las investigaciones del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología es el uso de la capacidad lixivante que tienen los microorganismos para disolver metales a partir de minerales de baja ley. Dicha disolución

favorece la recuperación del metal y por tanto simplifica los procesos de pirometalurgia, los cuales también son procesos eficientes de lixiviación, pero no muy amigables para el ambiente. La caracterización de algunas bacterias en biominería ha permitido conocer el sustrato que utilizan para crecer. *At. ferrooxidans*, *At. ferrivorans* y *At. ferridurans* utilizan el hierro ferroso (Fe^{2+}) como donador de electrones (Tabla 1), *At. thiooxidans* y *At. caldus* utilizan solo el azufre elemental. Además, *At. ferrivorans* y *At. ferrooxidans* también utilizan el CuS como sustrato.

Tabla 1. Caracteres taxonómicos de especies de *Acidithiobacillus* sp.

Carácter	<i>At. ferrivorans</i>	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>At. ferridurans</i>	<i>At. thiooxidans</i>	<i>At. caldus</i>
<i>Motilidad</i>	Altamente Móvil	Móvil	Móvil	Móvil	Móvil
<i>Donador de e⁻</i>					
<i>Fe²⁺</i>	+	+	+	-	-
<i>CuS</i>	+	+	-	-	-
<i>S⁰</i>	+	+	+	+	+

Adaptado de Hallberg *et al.* (2010)

2.2.2. Biolixiviación bacteriana por *At. ferrivorans*

a) Fundamentos de biolixiviación en *At. ferrivorans*.

La biolixiviación bacteriana puede llevarse a cabo de manera directa (a través del contacto directo con el mineral) o indirecta (sin contacto con el mineral, tan solo acidificando el medio). *At. ferrivorans* puede oxidar un mineral a temperaturas cercanas a 5°C (Hallberg *et al.*, 2010) con mayor rendimiento a lo que puede *At. ferrooxidans* a la misma temperatura. Además, *At. ferrivorans* tiene una crecimiento óptimo a 25°C (Kupka *et al.*, 2007); estas dos características la catalogan como bacteria psicrotolerante. Por otro lado, a pesar de que *At. ferrivorans* tolera bajas temperaturas, puede realizar la oxidación de los mismos minerales (pirita y sulfuros) que *At. ferrooxidans* (Barahona *et al.*, 2014). La capacidad oxidante a bajas temperaturas de *At. ferrivorans* la convierte en la mejor candidata cuando se requiere realizar procesos de biolixiviación de escala industrial en zonas donde la

temperatura normal está por debajo de 10°C, como las minas ubicadas en gran altitud en los Andes del Perú.

b) Mecanismos moleculares de *At. ferrooxidans* para la biolixiviación.

El mecanismo de biolixiviación, independientemente de que se lleve a cabo de manera directa o indirecta, se basa en la toma de electrones desde el Fe^{2+} que son llevados hacia el interior de la bacteria. El mecanismo molecular para que la bacteria transporte el electrón hacia su interior aún no es claro, especialmente para la especie *At. ferrivorans*. Los mecanismos mejor estudiados hasta el momento se han realizado para la bacteria *At. ferrooxidans* (Fig. 1) (Quatrini *et al.*, 2009). Se describe que los electrones pueden ser extraídos por la proteína Citocromo C (Cyc2), que se encuentra embebida en la membrana externa, hacia la proteína rusticianina y luego es interiorizada; pero los últimos estudios (Li y Li, 2014) han revelado que el transportador inicial de los electrones es el pili Tipo IV, el cual serviría como un nanocable por donde los electrones se transportan hasta al Cyc2.

c) Transporte de electrones desde el Cyc2

Un modelo de la oxidación de Fe^{2+} en *At. ferrooxidans* basado en evidencia bioquímica, genética molecular, bioenergética, bioinformática y genómica funcional se puede explicar mediante los estudios realizados principalmente por Quatrini *et al.* (2009) (Fig. 1). Los electrones extraídos de la oxidación de Fe^{2+} por la Cyc2, embebida en la membrana externa, se pasan a la proteína periplásmica rusticianina. Desde la rusticianina, los electrones pueden tener una vía de descarga *downhill* para reducir el O_2 a agua (flecha sólida, Fig. 1), para esto, los electrones tienen que pasar a través del citocromo C₄ (Cyc1) y el complejo citocromo oxidasa tipo aa3 o un camino distinto *uphill* (flecha entrecortada, Fig. 1) al complejo NADH a través del citocromo CycA1 (Fig. 1), el complejo bc1 y quinonas asociadas a la membrana, esta vía estaría destinada a la formación de biomasa (Castelle *et al.*, 2008).

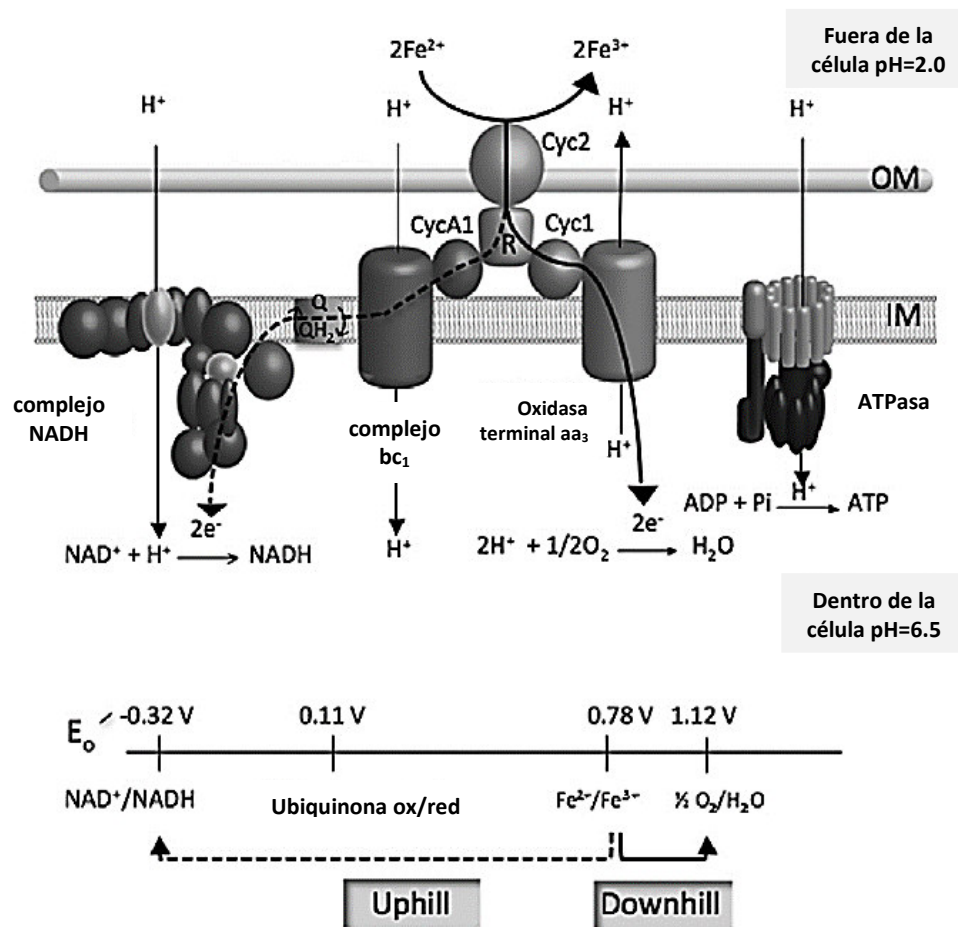


Figura 1. Modelo oxidativo de hierro ferroso en *At. ferrooxidans*. Un perfil rédox se ha colocado debajo del modelo para facilitar la comparación de los potenciales rédox de algunas de las reacciones. R, rusticianina, OM, membrana externa, IM, membrana interna. Valores de E_0 para la parejas $Fe(III)/Fe(II)$ y O_2/H_2O a pH 2.0. Figura adaptada de Quatrini *et al.* (2009).

La energía para empujar electrones *uphill* en contra de la gradiente sería termodinámicamente desfavorable (Quatrini *et al.*, 2009) y se postula que viene de la afluencia de protones (flechas sólidas, Fig. 1) generado por la fuerza motriz de protones a través de la membrana interna resultante de la diferencia en la concentración de protones dentro de la célula (pH 6.5) y fuera de la célula (pH 2.0). Esta vía *uphill* es similar en muchos aspectos a las vías tomadas por los electrones y protones en la fosforilación oxidativa mitocondrial y de procariotas, sólo que en sentido inverso. La figura 1 también muestra la afluencia de protones a través del complejo ATP sintetasa (ATPasa) que conduce a la biosíntesis de ATP. Estos protones y también aquellos que entran en la célula para conducir electrones *uphill* se postulan que son consumidos, al menos en parte, por la reducción de

O₂ al agua, utilizando electrones derivados de la oxidación de Fe²⁺ a través de la vía *downhill* (Bonnefoy, *et al.*, 2012).

d) Regulación génica de *At. ferrivorans* para la biolixiviación.

Los determinantes genéticos y la biología molecular de la oxidación del Fe²⁺ y compuestos inorgánicos azufrados han sido ampliamente estudiados para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una especie estrechamente relacionada con *At. ferrivorans* SS3 (Quatrini *et al.*, 2009). Los genes de *At. ferrooxidans* que están sobrerregulados durante el crecimiento en Fe²⁺ se agrupan en tres operones. El primero, el operón *rus*, codifica una citocromo oxidasa, una rusticianina, y dos citocromos que transportan electrones de Fe²⁺ al O₂. El segundo, el operón *petI*, codifica el complejo de bc1, y el tercer operón es responsable de la biogénesis del complejo citocromo c oxidasa. Un conjunto diferente de genes se sobrerregula durante el crecimiento en S⁰ y CuS (Quatrini *et al.*, 2009). Estos son los genes que codifican para la expresión de ubiquinol citocromo C reductasa (*petII*), el complejo heterodisulfuro reductasa (*hdr*), la sulfuro quinona reductasa (*sqr*), el citocromo bd, las oxidasas ubiquinol bo3, un complejo (doxDA) tiosulfato quinona oxidorreductasa (TQO) y la tetrionato hidrolasa (tetH). En contraste, la oxidación de S⁰ por *At. caldus* es mediada por la azufre oxigenasa reductasa (Sor) (Mangold *et al.*, 2011) y la oxidación de CuS es mediada por la sulfuro quinona reductasa (Cherney *et al.*, 2012).

Todos los análisis comparativos realizados por herramientas bioinformáticas, de los genes de *At. ferrooxidans*, sugirieron que *At. ferrivorans* codifica enzimas de oxidación de Fe²⁺ homólogos ya que estos fueron identificados en el genoma de *At. ferrivorans* SS3 (Quatrini *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2011). Sin embargo, el genoma de *At. ferrivorans* SS3 también revela diferencias importantes: (i) la presencia de *iro*, un gen que codifica una proteína de alto potencial oxidativo de hierro, previamente reportada a ser la primera enzima oxidante de Fe²⁺ en *At. ferrooxidans* JCM 7811 (Fukumori *et al.*, 1988), (ii) la presencia de un gen de proteína hipotética en el grupo de genes *rus* que está ausente en *At. ferrooxidans*, (iii) la ausencia de *ctaR* en el grupo de genes *cta* de *At. ferrivorans* SS3, y (iv) la presencia de

genes que codifican dos rusticianinas tipo b (RusB) en el genoma. Estas diferencias, en conjunto, indican que *At. ferrivorans* puede utilizar una vía de oxidación de Fe^{2+} similar, pero no idéntica a la de *At. ferrooxidans*. La vía para oxidación de compuestos inorgánicos azufrados por *At. ferrivorans* sigue siendo una interrogante, se ha deducido que su genoma contiene los genes que codifican las proteínas oxidantes de compuestos inorgánicos azufrados a partir de ambos genomas, de *At. ferrooxidans* y *At. caldus* (Chen *et al.*, 2012).

e) Genes de tolerancia al frío en la bacteria psicrotolerante *At. ferrivorans*.

A fin de poder realizar el mismo metabolismo que *At. ferrooxidans*, *At. ferrivorans* debe tener un mecanismo de respuesta o de adaptación a bajas temperaturas sin alterar su capacidad oxidativa. Según Liljeqvist *et al.* (2012) existen 5 mecanismos en bacterias para responder ante una disminución de la temperatura:

1. Alterando la fluidez de la membrana.
2. Cambiando la conformación del DNA.
3. Alterando la conformación del RNA.
4. Modificando la velocidad de síntesis de proteínas en la traducción.
5. Cambiando la conformación de las proteínas.

Todas estas alteraciones pueden ser controladas mediante la regulación génica y la acción de proteínas.

Para propósito de la investigación, se realizará una descripción del genoma de *At. ferrivorans* SS3 y de los genes de tolerancia al frío. El genoma de *At. ferrivorans* SS3 consta de 3.21 Mpb (3207552 pb) con un contenido de GC de 56,6%. La anotación reveló un total de 3335 genes distribuidos en un solo cromosoma, de los cuales 3093 genes codifican proteínas entre ellas 986 fueron anotados como proteínas hipotéticas (Liljeqvist *et al.*, 2012).

Una característica interesante en el genoma de *At. ferrivorans* SS3 es que codifica tres proteínas de unión al DNA que se inducen cuando hay choque al frío (con números de acceso AEM46325, AEM47146 y AEM49006), mientras que otros *Acidithiobacillus* sp. secuenciados sólo contienen uno cada uno (Liljeqvist *et al.*, 2012). Además contiene 1 operón para síntesis de trehalosa (Fig. 2) que codifica genes como la trehalosa sintasa, malto-oligosiltrehalosa trehalohidrolasa y malto-oligosiltrehalosa sintasa posiblemente relacionados con la tolerancia al frío (Liljeqvist *et al.*, 2012).

El genoma de *At. ferrivorans* SS3 también contiene los genes que codifican una desaturasa δ -12 putativa, dos sintasas de ciclopropano acil-fosfolípido graso, y una proteína hipotética de membrana de la superfamilia de FADS (superfamilia ácido graso como desaturasa). Esta última tiene una identidad del 35% a una proteína hipotética en la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC7120 como el mejor homólogo identificado (Liljeqvist *et al.*, 2012). Sistemas de desaturación de membrana y proteínas de choque en frío son fundamentales para el crecimiento de baja temperatura en varios microorganismos (Phadtare y Inouye, 2008; Shivaji y Prakash, 2010). Sin embargo, la codificación de varias proteínas de choque en frío no necesariamente indica psicrotolerancia, tal como *E. coli* que tiene siete proteínas de choque en frío y no puede crecer por debajo de 10°C (Phadtare y Inouye, 2008).

2.2.3. Propiedades de la trehalosa

Una variedad de azúcares son conocidos en mejorar la estabilidad celular, entre ellos, la trehalosa, un disacárido no reductor compuesto de dos glucosas unidas por un enlace glucosídico α, α -1,1, parece ser uno de los protectores más efectivos. Tanto *in vivo* como *in vitro*, la trehalosa protege bioestructuras tales como las proteínas y las membranas de daños debido a la deshidratación, el calor o frío (Jain y Roy, 2009).

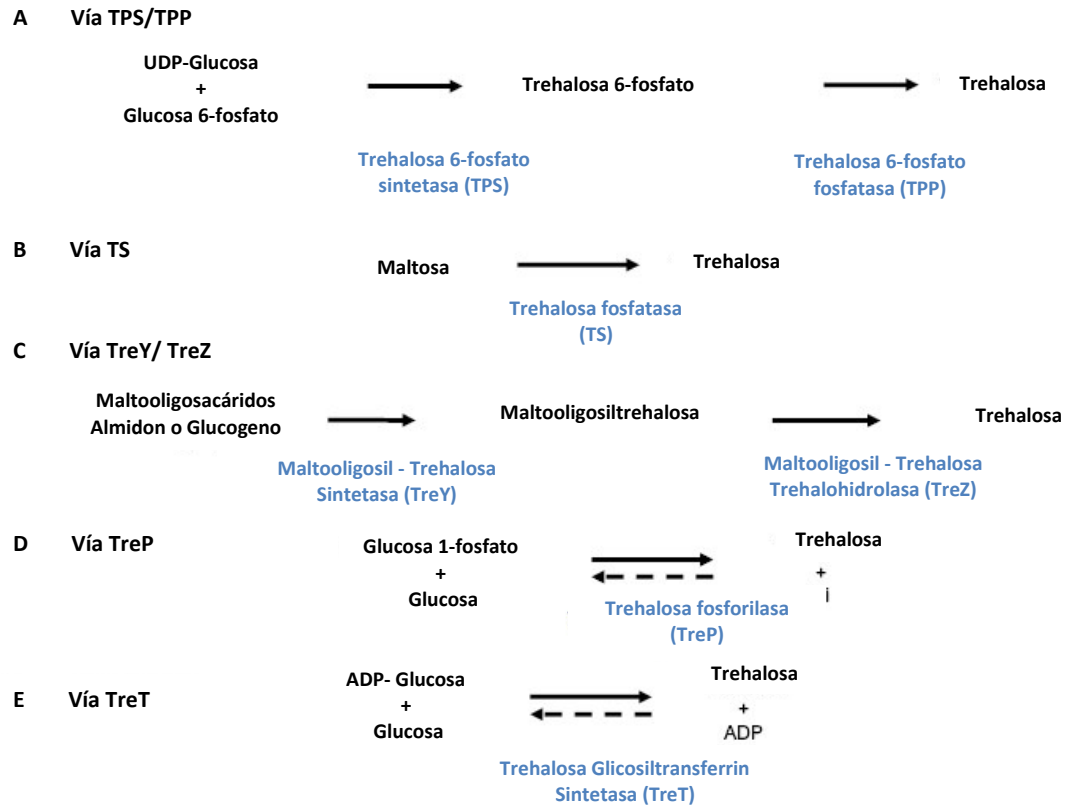


Figura 2. Vías biosintéticas de la trehalosa en microorganismos. La primera vía (A) consiste en dos etapas enzimáticas catalizadas por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa-fosfatasa (TPP). TPS cataliza la transferencia de glucosa a partir de UDP-glucosa a glucosa 6-fosfato formando trehalosa 6-fosfato (T6P) y UDP, mientras TPP desfosforila T6P a trehalosa y fosfato inorgánico. En la segunda vía de biosíntesis (B), la enzima trehalosa sintasa (TS) isomeriza el enlace $\alpha 1-\alpha 4$ de maltosa a un enlace $\alpha 1-\alpha 1$, formando trehalosa. La tercera vía (C) implica la conversión de maltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón) a trehalosa. En la cuarta vía (D y E), trehalosa fosforilasa (TreP), presente en algunos hongos, cataliza la hidrólisis reversible de trehalosa en presencia de fosfato inorgánico (Avonce *et al.*, 2006).

La trehalosa también se ha implicado en la protección de los organismos contra el estrés inducido por el frío. La restauración de los genes *otsa/otsb* de un mutante de delección de *E. coli* para estos dos genes conduce a un aumento esperado en la producción de trehalosa y también a un aumento en la viabilidad del mutante a 4°C (Kandror *et al.*, 2002). Se planteó la hipótesis de que la trehalosa impide la inactivación y la agregación de las proteínas a temperatura más baja y estabiliza la membrana celular por retrasar la aparición de

desplazamiento de fase de cristal líquido a estado gel (Kandror *et al.*, 2002). También se cree que la trehalosa aumenta la viscosidad citoplasmática, disminuyendo así la posibilidad de formación de cristales de hielo intracelulares que son a menudo fatales (Rudolph *et al.*, 1986; Jain y Roy, 2009).

2.2.4. Secuenciamiento por Illumina HiSeq™ 2000

a) Flujo de trabajo en plataforma de Illumina®

El flujo de trabajo de secuenciación de Illumina® se basa en cinco pasos (Fig. 3): (i) las librerías se preparan a partir de prácticamente cualquier muestra de ácido nucleico, (ii) se verifica la calidad de la librería, (iii) son amplificadas para producir grupos clonales, (iv) se secuencian usando síntesis masiva y paralela, y (v) se analizan los datos crudos del secuenciamiento. La preparación de librerías se puede realizar utilizando los kits simplificados de preparación muestra de Illumina TruSeq o kits de preparación de muestra de DNA compatible con el secuenciador Nextera Illumina. La generación de clústeres se produce en el sistema de generación de clúster automatizado cBot, donde el tiempo de trabajo es menos de diez minutos, comparado con más de seis horas de trabajo cuando se utilizan los métodos de PCR en emulsión. El proceso de creación de *templates* de secuenciación se completa en aproximadamente cuatro horas por celda de flujo. Para la secuenciación, uno o dos celdas de flujo se pueden cargar en HiSeq™ 2000, lo que permite diferentes condiciones experimentales para ejecutarse simultáneamente. Reactivos de secuenciación preconfigurados se dejan caer en los *racks* antes del inicio de la corrida (Protocolo de Illumina® para secuenciamiento en sistemas HiSeq™ 2000).



Figura 3. Flujo de trabajo para secuenciamiento por Illumina®. Este flujo consiste de cinco pasos. (1) la preparación de librería, (2) verificación de la calidad de la librería, (3) clustering de los fragmentos generados en la librería, (4) secuenciamiento en una plataforma Illumina y por último (5) el análisis de datos, ya sea la calidad y la limpieza de los reads generados, y la conversión de datos de formato *.bcl* a *.fastq*. Adaptado de Illumina®.

b) Preparación de librería genómica

b.1) Preparación acelerada de muestra

El flujo de trabajo de preparación de la muestra siguiendo TruSeq DNA se ha racionalizado aún más mediante la eliminación de la etapa de PCR y la sustitución de selección de tamaño a base de gel con la selección basado en perlas (Fig. 4). Este kit ofrece una flexibilidad sin precedentes, con dos opciones de protocolo para generar insertos de 550

pb y 350 pb, lo que apoya una variedad de aplicaciones. Los reactivos Master-mix que cuentan con perlas (*beads*) de purificación de muestras y protocolos optimizados, contribuyen al flujo de trabajo de construcción de la biblioteca simplificada, lo que requiere mínimo tiempo de trabajo y pocos pasos de limpieza para el procesamiento de un gran número de muestras. Por otro lado, la preparación de muestras con el protocolo “TruSeq DNA libre de PCR” disminuye el tiempo de preparación de la biblioteca, potenciando las aplicaciones de secuenciación microbiana hasta secuenciación de genomas humanos (Protocolo de Illumina® para preparación de librerías TruSeq DNA libre de PCR).

b.2) Preparación química de muestra: TruSeq DNA libre de PCR

Los kits de preparación de muestra, TruSeq DNA libre de PCR, son utilizados para preparar librerías de DNA para secuenciamiento de *read* único, apareados (*paired end*) e indexados. El protocolo soporta la fragmentación de DNA por ultrasonido Covaris, lo que requiere 1 g de DNA de entrada para un tamaño medio de inserción de 350 pb ó 2 g de DNA para un tamaño medio de inserción de 550 pb. La construcción de la librería comienza con la fragmentación del DNA genómico (gDNA) (Fig. 4A). Se generan los fragmentos de DNA de extremos romos y se utiliza una combinación de reacciones de *fill-in* y de actividad exonucleasa (Fig. 4B), luego, la selección de tamaño se realiza con perlas de purificación (Fig. 4C). Una base de adenina (A) se añade a los extremos romos de cada hebra y las preparan para la ligación a los adaptadores indexados (Fig. 4D).

Cada adaptador contiene una base de timina (T) *overhang* para ligar el adaptador al DNA fragmentado con una cola A. Estos adaptadores contienen la dotación completa de sitios de hibridación de cebadores de secuenciación de *read* único, *paired-end* e indexado. Sin necesidad de amplificación por PCR adicional, los adaptadores únicos o de doble índice se ligan a los fragmentos y las muestras están listas para la generación de clústeres (Figura 2E).

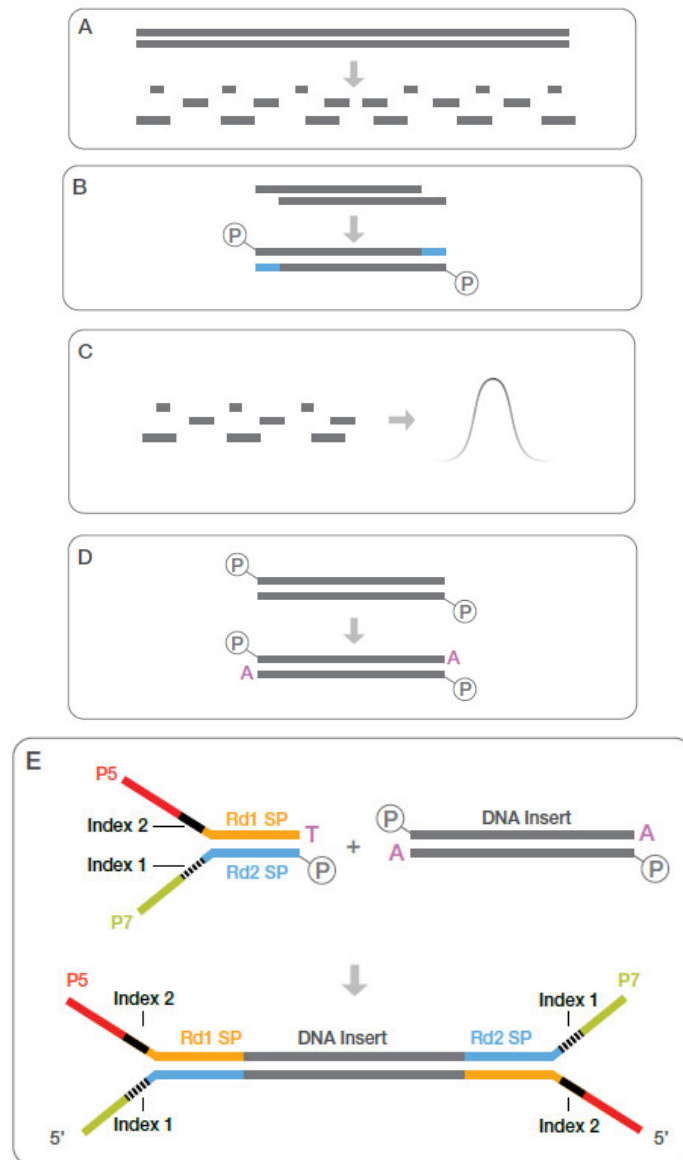


Figura 4. Preparación de librería química para secuenciamiento por Illumina®. La construcción de librería inicia con la fragmentación del DNA (A). Fragmentos con extremos pegajosos son creados (B). Fragmentos con seleccionados por tamaño con *beads* de purificación (C). Una base de A es agregada (D). Adaptadores dual-indexados con ligados a los fragmentos y el producto final está listo para la generación de clústeres. Adaptado de Illumina®.

2.2.5. Herramientas bioinformáticas para genómica comparativa

a) MultiParanoid

Es un nuevo programa de análisis a escala de proteomas que encuentra automáticamente relaciones de ortología entre las proteínas en varios proteomas. El programa es una extensión del programa InParanoid que identifica ortólogos en las comparaciones por pares de proteomas. MultiParanoid aplica un algoritmo de agrupamiento *clustering* para combinar varios grupos ortólogos a pares de InParanoid dentro de grupos ortólogos multi-especie. Para evitar *outparalogs* en el mismo grupo, MultiParanoid sólo combina especies que comparten el mismo ancestro (Alexeyenko *et al.*, 2006).

b) IslandViewer

El programa IslandViewer (<http://pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) es una aplicación web accesible para la predicción computacional y el análisis de Islas Genómicas (IG) en los genomas de bacterias y arqueas (Dhillon *et al.*, 2013). Las IGs están constituidas por grupos de genes de probable transferencia horizontal y son de gran interés, ya que de manera desproporcionada codifican factores de virulencia y otras adaptaciones de interés médico, ambiental e industrial. Existen muchas herramientas computacionales para la predicción de las IGs, pero tres de los métodos más precisos están disponibles en forma integrada a través de IslandViewer: IslandPath-DIMOB, SIGI-Hmm y IslandPick (Dhillon *et al.*, 2013).

c) BRIG

El programa BRIG es capaz de generar imágenes de comparación de genomas circulares para procariotas, mostrando múltiples comparaciones del genoma en una sola imagen, y mostrar la similitud entre un genoma de referencia en el centro frente a otras secuencias de consulta como un conjunto de anillos concéntricos de color de acuerdo al % de identidad obtenido por BLAST (Alikhan *et al.*, 2011).

d) CGview (CCT)

Es una herramienta de comparación visual para genómica comparativa bacteriana (Grant *et al.*, 2012). El CCT se puede utilizar para comparar visualmente una secuencia de referencia a miles de genomas existentes o colecciones de secuencia (secuenciación de próxima generación) en un ordenador de escritorio estándar. Proporciona análisis y funcionalidad de visualización que no está disponible en cualquier herramienta existente de visualización de genomas (Grant *et al.*, 2012). CCT presenta visualmente la información de la secuencia de conservación junto con las clasificaciones funcionales y características de composición de secuencia, y puede ser una herramienta útil para identificar rápidamente secuencias cambiantes o nuevas, secuencias transferidas horizontalmente, o propiedades funcionales inusuales en nuevos genomas secuenciados.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Hi: Existen regiones en el genoma de una cepa nativa de *At. ferrivorans* que agrupan un conjunto de genes únicos que están involucrados en la adaptación a bajas temperaturas.

Ho: No existen regiones en el genoma de una cepa nativa de *At. ferrivorans* que agrupen un conjunto de genes únicos que no están involucrados en la adaptación a bajas temperaturas.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes relacionados a la tolerancia al frío en el genoma de una cepa nativa psicrotolerante de *Acidithiobacillus ferrivorans* mediante genómica comparativa con otros genomas de especies de *Acidithiobacillus*.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Secuenciar, ensamblar y anotar el genoma de una cepa nativa de *Acidithiobacillus ferrivorans*.
2. Identificar y describir los genes involucrados en la resistencia al frío de una cepa nativa de *Acidithiobacillus ferrivorans* con otras cepas de *Acidithiobacillus*.
3. Construir una red preliminar de interacción génica entre los genes involucrados a la resistencia al frío y los genes involucrados en la oxidación de Fe^{2+} de una cepa nativa de *Acidithiobacillus ferrivorans*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento de cepas bacterianas

Las muestras se obtuvieron de pasivos mineros del departamento de Pasco, Perú. El aislamiento de cepas de *Acidithiobacillus* sp. se realizó por siembra en placa de medio sólido: solución A de 45 ml con 2.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.05 g de tripticasa de soya, solución B de 50 ml con 1 g de agarosa y solución C de 5 ml con 0.695 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ajustado a 2.5 pH con 10N de H_2SO_4); las soluciones A y B fueron esterilizadas en autoclave a 15 psi por 15 minutos y la solución C fue esterilizada por filtración. Las colonias fueron identificadas siguiendo la descripción de Hallberg *et al.* (2010), que describe a la colonia de *A. ferrivorans* con el centro rojizo y un halo blanco que la rodea (Fig. 5).

4.2. Evaluación de capacidad oxidativa de cepas bacterianas de *Acidithiobacillus* sp.

Inicialmente, un total de 12 cepas bacterianas (Tabla 2) fueron inoculadas en medio 9K (g/L): 33.3 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.04 de KH_2PO_4 , pH 2.0 (Ramírez *et al.*, 2004). Para la reactivación de las cepas estas se incubaron a temperatura ambiente ($\sim 24^\circ\text{C}$) en agitación orbital (200 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial; el proceso fue repetido una vez más y verificado mediante recuento en una cámara Petroff-Housser. Después del segundo cultivo, las células fueron centrifugadas a 13000 rpm y el pellet resultante, para cada una de las 12 cepas, fue resuspendido y lavado con agua ácida a pH 2.0 y centrifugado a 13000 rpm, el proceso se repitió tantas veces como era necesario hasta retirar todo el hidróxido de hierro precipitado. El pellet resultante fue resuspendido en 1 ml e inoculado a matraces de 100 ml con 50 ml de Medio Base (g/L): 0.4 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 0.04 de KH_2PO_4 , a pH 2.5 y con CuS al 0.5%; los cultivos se incubaron en agitación rotatoria a 200 rpm a ambiente temperatura para su adaptación. Los cultivos crecieron hasta alcanzar una densidad de $3 \cdot 5 \times 10^8$ células/ml. Estos fueron centrifugados y lavados con agua ácida 3 veces para retirar el exceso de CuS; una segunda fase de cultivo en CuS 0.5% fue llevada a cabo. El CuS precipitado fue

retirado mediante lavados con agua ácida y el pellet limpio fue inoculado en el medio base más CuS al 0.5% y llevados a una temperatura de 5°C en agitación 200 rpm.

La cinética de crecimiento de 12 cepas bacterianas fue evaluada mediante recuento en cámara Petroff Housser. Las alícuotas para el conteo fueron extraídos cuidadosamente para no cambiar bruscamente la temperatura del cultivo.

4.3. Identificación molecular de cepas bacterianas

Las cepas fueron cultivadas en medio 9K hasta que alcanzaron una densidad de $3\text{-}5 \times 10^8$ células/ml; las células fueron centrifugadas y el *pellet* fue resuspendido y lavado con agua ácida a pH 2.0 y centrifugado a 13000 rpm, el proceso se siguió 4 veces más; posterior a esto, el *pellet* fue lavado con citrato de sodio 10 mM a pH de 7.0. El *pellet* resultante fue utilizado para la extracción de DNA genómico con el DNA Purification Kit Wizard Genomic (Promega®). Posteriormente, el gen ribosomal RNA 16S fue amplificado con los cebadores universales 27F y 1492R con el protocolo de 30 ciclos: 30s a 94°C para desnaturalización, 45s a 57°C para hibridación y 90s a 72°C para la elongación, con una desnaturalización inicial de 300s a 94°C de y una elongación final de 420s a 72°C. Los productos amplificados fueron secuenciados por método de Sanger en MacroGen™, usando los primers 27F, 518F, 800R y 1492R. Los perfiles cromatográficos fueron revisados con el programa Chromas Lite (Technelysium Pty., Australia). El alineamiento y la presentación de alineamientos fueron realizados con ClustalX (Chenna *et al.*, 2003.) y Boxshade respectivamente.

4.4. Secuenciamiento total del genoma de *At. ferrivorans* PQ33

La cepa PQ33, que tuvo un mejor perfil oxidativo de sulfuro de cobre a 5°C, fue enviada a MacroGen™ para el secuenciamiento total del genoma. En la preparación de la librería se utilizó el protocolo de TruSeq™ de Illumina® dejando insertos aproximados de 400 pb y *reads* de 100 pb (Fig. S2). El secuenciamiento de siguiente generación se realizó utilizando la tecnología HiSeq™ 2000 de Illumina® (Fig. S1).

4.5. Ensamblaje y anotación del genoma de *At. ferrivorans* PQ33

La calidad de los *reads* del secuenciamiento fue verificada por el programa FastQC (Babraham Institute, Bioinformatics), los *reads* de baja calidad fueron descartados y la limpieza de secuencias *index* y *adapters* de los *reads* fue revisada con FastQC. Se realizó, paralelamente, tres ensamblajes de *novovo* con los programas Velvet (Zerbino *et al.*, 2008), SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) (Fig. S3 y Fig. S4) y el *pipeline* A5 (Tritt *et al.*, 2012). Asimismo, el programa CISA fue utilizado para integrar los ensamblajes generados y obtener un ensamblaje híbrido (Lin *et al.*, 2013). Adicionalmente, los *reads* fueron utilizados para extender los *contigs* y reparar *gaps* a través de los programas ABACAS (Assefa *et al.*, 2009) e IMAGE (Swain *et al.*, 2012). La calidad de todos los ensamblajes fue verificada con el programa QUAST (Gurevich *et al.*, 2013).

La predicción de secuencias codificantes fue realizada a través de la herramienta de anotación para procariotas Prokka (Seemann, 2014). Además, el programa Prodigal se utilizó para el hallazgo de secuencias codificantes (Hyatt *et al.*, 2010) y la anotación se realizó por medio del programa BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009), que fue usado de forma local contra las bases de datos del UniProt (Apweiler *et al.*, 2004), que contiene solo proteínas con evidencia experimental y no son fragmentos, y la base de datos RefSeq; para la anotación se eligió el mejor *match*. Adicionalmente, modelos de Markov escondidos con Hmmscan (Eddy, 2011) fueron utilizados contra bases de datos de Pfam (Punta *et al.*, 2012) y TIGRFAMs (Haft *et al.*, 2013). Adicionalmente, las herramientas tRNAScan-SE tool (Lowe *et al.*, 1997) y RNAmmer (Lagesen *et al.*, 2007) se utilizaron para hallar tRNA y rRNA respectivamente. La asignación de péptidos líder se realizó con SignalP (Petersen *et al.*, 2011). El programa Infernal (Kolbe y Eddy, 2011) se utilizó para el hallazgo de RNA no codificante.

4.6. Identificación de genes ortólogos y genes únicos de genomas de *Acidithiobacillus* sp.

Los cuatro genomas de cepas de *Acidithiobacillus* sp (*At. ferrooxidans* ATCC 23270, *At. ferrooxidans* ATCC 53993, *At. ferrivorans* SS3 y *At. ferrivorans* CF27 con números de accesoión CP001219, CP001132, CP002985 y PRJEB5721 respectivamente) y el de *At. ferrivorans* PQ33 fueron utilizados para la identificación de genes ortólogos a través de los programas PGAP (Zhao *et al.*, 2012) y LS-BSR (Sahl *et al.*, 2014).

El patrón conservativo a nivel nucleotídico del *genome core* entre las cuatro cepas del género *Acidithiobacillus* fue visualizado con el programa MeV (Chu *et al.*, 2008). La extracción de genes a partir de los 4 genomas de *Acidithiobacillus* sp. fue realizada con los programas *Makeblastdb*, *Blast+* (Camacho C., 2015) y un script diseñado para extraer las secuencias a partir de los alineamientos; todos los programas fueron corridos de forma local. El programa EasyFig fue utilizado para visualizar el alineamiento de los fragmentos genómicos que componen los operones *rus* (Sullivan *et al.*, 2011) y el programa CGview se usó para la visualización del operón de trehalosa (Grant *et al.*, 2012).

4.7. Identificación de Islas Genómicas

La identificación de IGs de *At. ferrivorans* se realizó a través de los siguientes criterios: (i) la diferencia en los contenidos de GC y GC *skew*; (ii) un locus presente en la cepa *At. ferrivorans* y ausente en las otras especies; (iii) la existencia de genes de movilidad tales como integrasas, transposasas y elementos de inserción en los límites del locus. La existencia de los locus se confirmaron usando IslandViewer, un predictor de IGs que integra tres métodos: IslandPick, IslandPath-DIMOB y SIGI-HMM (Dhillon *et al.*, 2013).

4.8. Flexibilidad comparativa de proteínas

La comparación de la flexibilidad de proteínas fue realizada con el programa DynaMine (Cilia *et al.*, 2013). Una propiedad que la distingue de otros métodos de predicción de flexibilidad es que este tiene un significado físico claro. El parámetro de orden S^2 está relacionado al ángulo de rotación dado por el vector del puente N-H del esqueleto de la proteína. Valores de S^2 más cercanos a 1.0 corresponden a segmentos rígidos en la proteína (por ejemplo dominios) y valores cercanos 0 corresponden a segmentos desordenados (por ejemplo segmentos que unen dominios) tal como describen Cilia *et al.* (2013).

A excepción de IslandViewer y Dynamine, todos los programas se corrieron de forma local, utilizando una workstation de 32Gb de RAM y un procesador XeonTM, en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

V. RESULTADOS

5.1. Caracterización fisiológica de Cepas de *Acidithiobacillus* sp

La capacidad oxidativa de las 12 cepas bacterianas fue evaluada de forma cualitativa para tres sustratos: sulfato ferroso, sulfuro de cobre al 0.5% y azufre elemental al 1.0%. La capacidad oxidativa del sulfato ferroso fue evaluada por medio de viraje de color desde transparente típico de sulfato ferroso hacia un color anaranjado rojizo del sulfato férrico. Para el sulfuro de cobre, el viraje del medio desde un color transparente hacia un color azul turquesa. En el caso del azufre elemental, la aparición de turbidez y el conteo de bacterias positivo. Para cada sustrato, la evaluación se realizó a temperatura ambiente (~24°C), a 10°C y 5°C. Todos los cultivos fueron positivos para el sulfato ferroso hasta 10°C, pero solo 7 cultivos dieron positivo para 5°C (Tabla 2). Cinco cultivos resultaron positivos para oxidación de CuS en 5°C. De estos, solo PQ33 mostró evidencia de crecimiento sostenido después de varios reinóculos en medio fresco. Las cepas de PQ506, PSB22, PYAN12 y PQ510 no mostraron crecimiento sostenido.

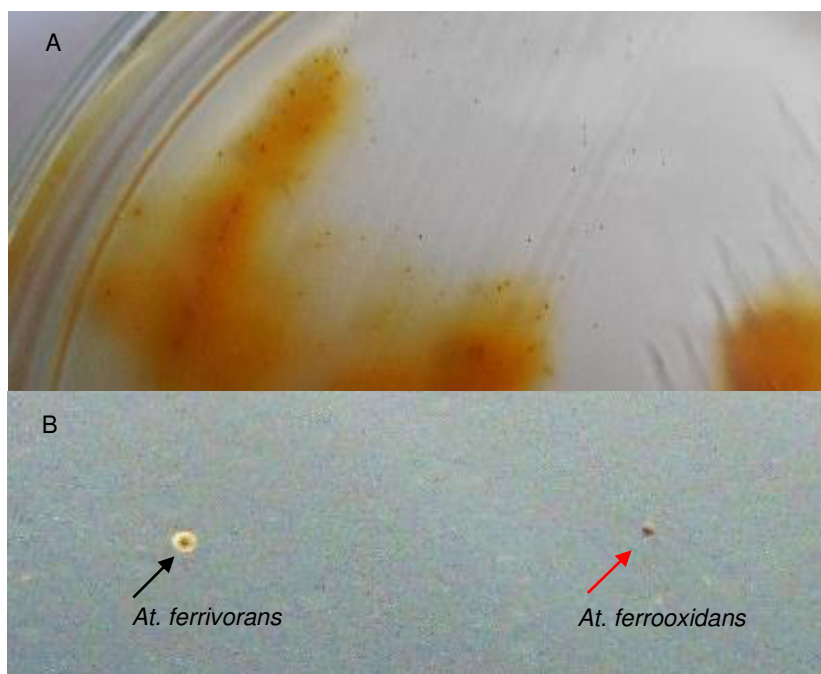


Figura 5. A) Cultivo en placa, en medio sólido con agarosa, de un consorcio de Pasco, Perú. B) Colonias de *Acidithiobacillus ferrivorans* (flecha negra) con un halo blanco alrededor de la colonia y *At. ferrooxidans* (flecha roja) como un punto rojo sin halo.

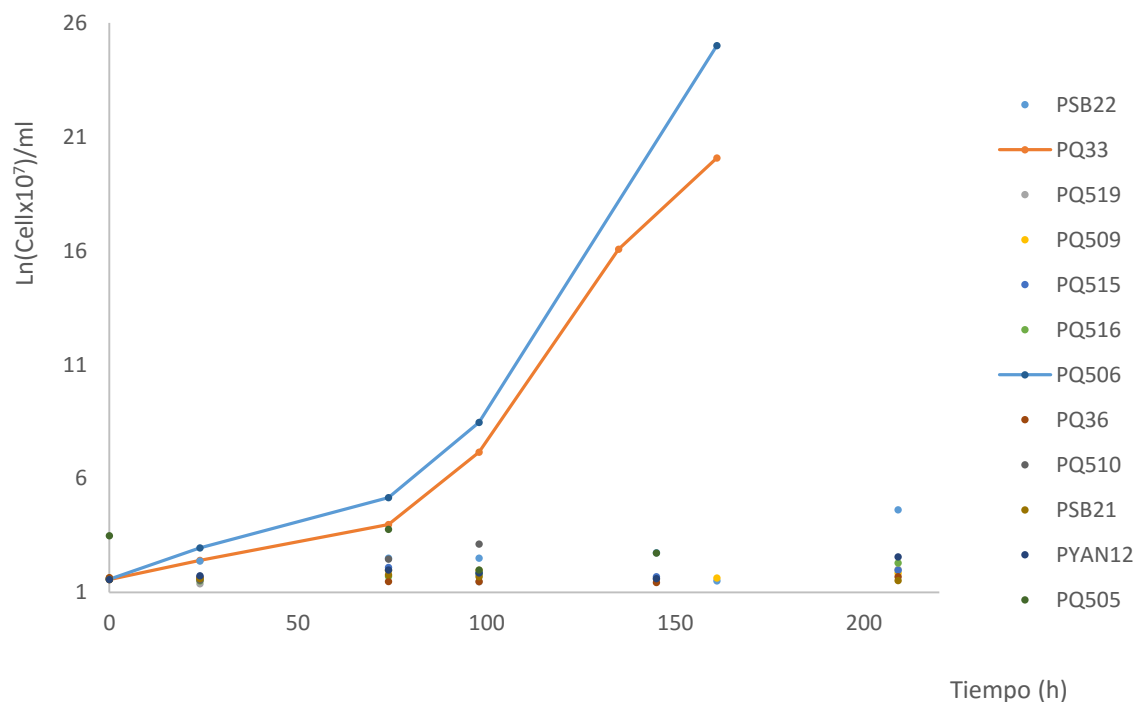


Figura 6. Cinética de crecimiento de doce cepas de *Acidithiobacillus* sp. utilizando sulfuro de cobre al 0.5% como única fuente de energía a una temperatura de 5°C. Las cepas PQ506 (línea celeste) y PQ33 (línea anaranjada) obtuvieron mayores velocidades de crecimiento.

Tabla 2. Caracterización fisiológica de cepas de *Acidithiobacillus* sp. en diferentes sustratos y a temperaturas de 24°C, 10°C y 5°C.

Cepa	Fe ²⁺			CuS 0.5%			S° 1.0%		
	24°	10°	5°	24°	10°	5°	24°	10°	5°
PQ505	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PQ506	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PQ509	+	+	-	+	+	-	+	+	-
PQ510	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PQ515	+	+	-	+	+	-	+	+	-
PQ516	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PQ519	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PQ33	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PYAN12	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PQ36	+	+	-	+	+	-	+	-	-
PSB21	+	+	-	+	+	-	+	-	-
PSB22	+	+	+	+	+	+	+	+	-

5.2. Oxidación bacteriana de sulfuro de cobre a bajas temperaturas

La cinética de crecimiento en CuS para 12 cepas (Fig. 6) muestra una tendencia exponencial solo para 2 cepas bacterianas, las cepas PQ506 y PQ33 (Fig. 6) por tener un tiempo de duplicación menor a las demás, 68 horas para PQ506 y 63 horas para PQ33. De las 12 cepas evaluadas, solo las 2 cepas descritas llegaron a una densidad celular de $3\text{-}5 \times 10^8$ células/ml (Fig. 6); las otras cepas mantuvieron o disminuyeron el número de bacterias del inóculo inicial.

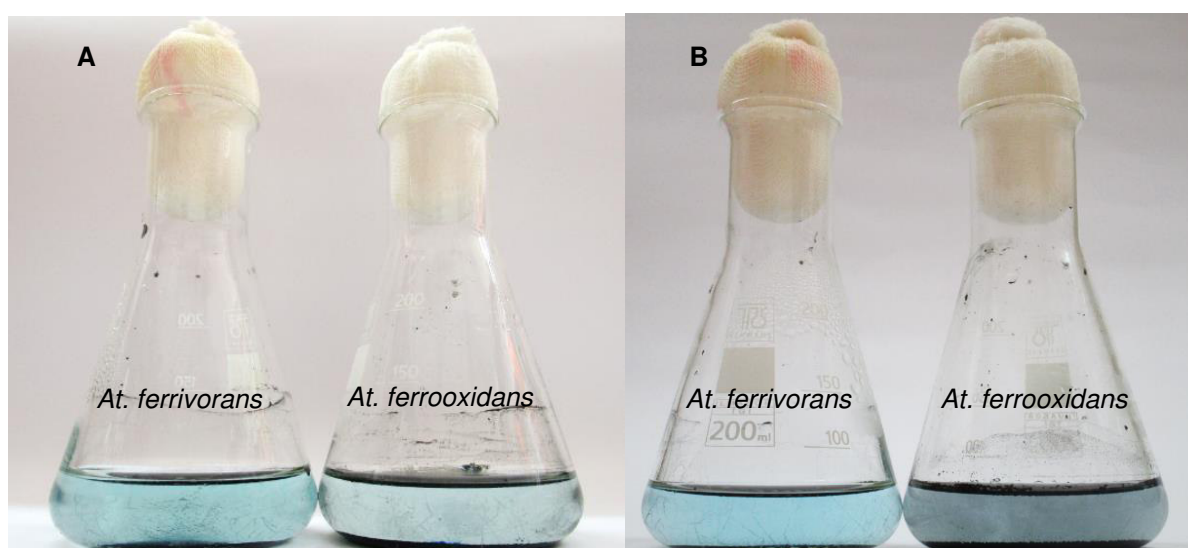


Figura 7. Cultivos de cepas de *At. ferrivorans* PQ33 (Izquierda) y *At. ferrooxidans* PQ506 (derecha) en Medio Base con Sulfuro de Cobre al 0.5%. A: Fotografía tomada hasta después de 15 días de cultivo. B: Fotografía tomada hasta después de 30 días de cultivo.

La evaluación cualitativa del crecimiento en CuS a 24°C, por el cambio del color del medio de transparente hacia azul, pudo extrapolarse al crecimiento a bajas temperaturas, donde se observó el mismo resultado aunque no con la misma intensidad. En un segundo reinóculo hacia otro medio fresco con CuS al 0.5%, el viraje del color del medio de la cepa PQ33 pudo observarse con mayor intensidad (Fig. 7), en cambio, en el segundo reinóculo de PQ506, no se reportó crecimiento.

Después de 15 días, el cultivo alcanzó una biomasa de 6.4×10^8 células/ml para la cepa *Acidithiobacillus* PQ33, cantidad que se mantuvo en el tiempo, sin variar, por otros 15 días más (Fig. 8). Bajo el microscopio pudo observarse células pequeñas fuera del estado de duplicación. El tiempo de duplicación en fase exponencial durante los primeros 15 días fue de 63.6 ± 3.9 horas y el cobre liberado después de 30 días fue de 1780 ± 32 mg/L (Fig. 8).

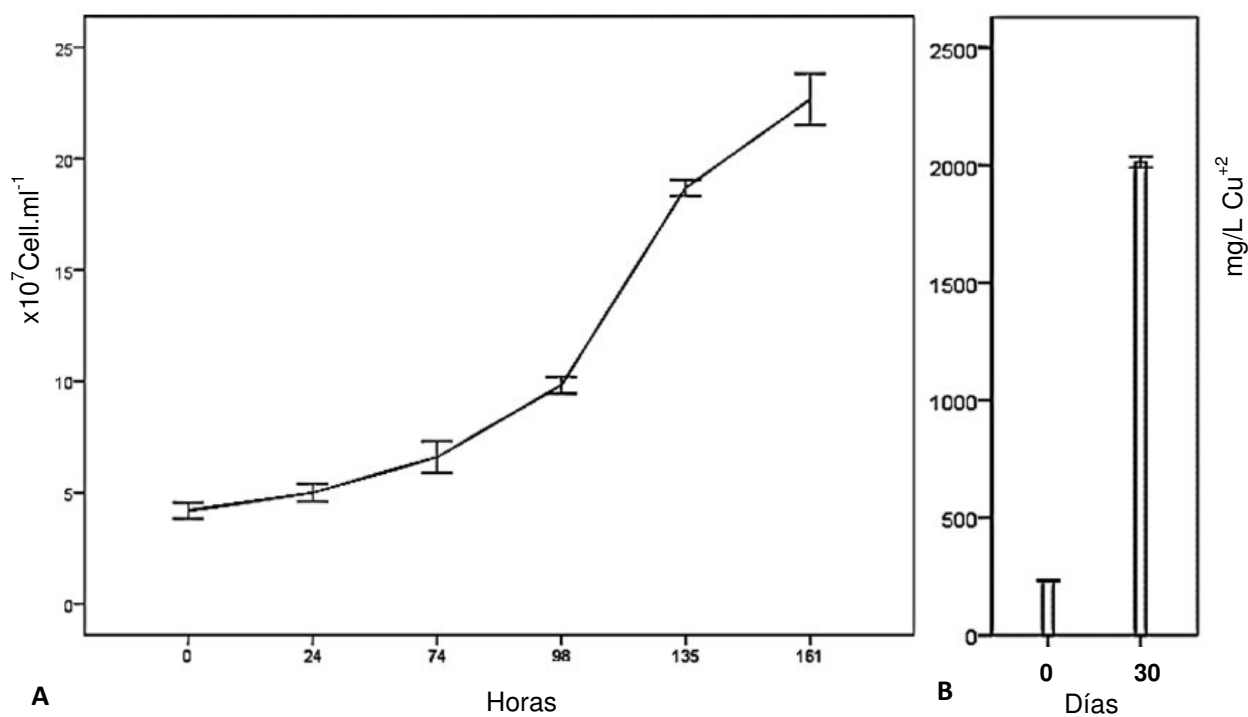


Figura 8. Curva de crecimiento de *Acidithiobacillus* PQ33 utilizando sulfuro de cobre al 0.5% como único sustrato oxidable a una temperatura de 5°C (A) y cuantificación de sulfuro de Cu lixiviado a partir de sulfuro de cobre después de 30 días (B).

5.3. Biopelícula en cultivos con CuS

Se observó una biopelícula alrededor del sustrato sulfuro de cobre (Fig. 9) en las cepas que crecieron a temperatura ambiente. Además, se notó la presencia de una bolsa coloidal, posiblemente debido a la expresión de polisacáridos por la bacteria sobre algunos cristales de CuS (Fig. 9: D-F); en algunos casos, los expolisacáridos permitieron la unión de varios cristales de CuS, lo que evidencia la naturaleza adherente de la biopelícula.

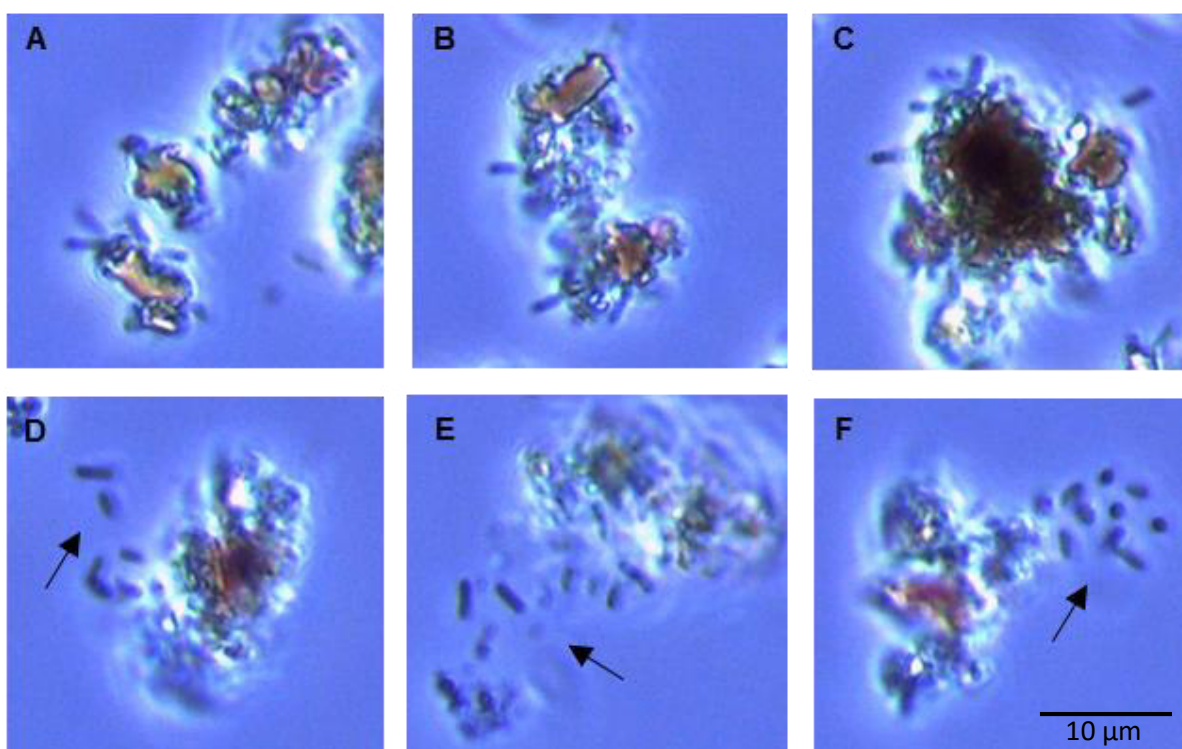


Figura 09. Presencia de biopelícula en cultivo de medio base más CuS al 0.5%. A-C: células bacterianas de *Acidithiobacillus* sp. adheridas a sulfuro de cobre. D-F: Presencia de bolsa coloidal que sujeta células bacterianas (flechas). En F se observa una bolsa coloidal más densa, el cuál puede ser generado por la cápsula de exopolisacáridos de cada bacteria individual.

5.4. Identificación de cepas por rRNA 16S

A ocho de las cepas nativas: PQ505, PQ506, PQ510, PQ516, PQ519, PQ33, PSB22 y PYAN12, se les amplificó un segmento de 1492 pb del rRNA 16S para identificación de las mismas. Cada secuencia individualmente fue contrastada con la base de datos (Números de acceso en Tabla S1). Cuatro de las cepas (PQ33, PQ510, PSB22 y PYAN12) fueron

identificadas como *Acidithiobacillus ferrivorans* mientras las otras cuatro (PQ505, PQ506, PQ516 y PQ519) fueron identificadas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Fig. 10); y se alcanzó un porcentaje de similitud del 100% con la secuencia 16S rRNA con la cepa *At. ferrivorans* SS3 (Genbank: NR_074660), y un porcentaje de 100% con las cepas *At. ferrooxidans* Fox1 (Genbank: JF934687) y LMT4 (Genbank: AM502931) respectivamente.

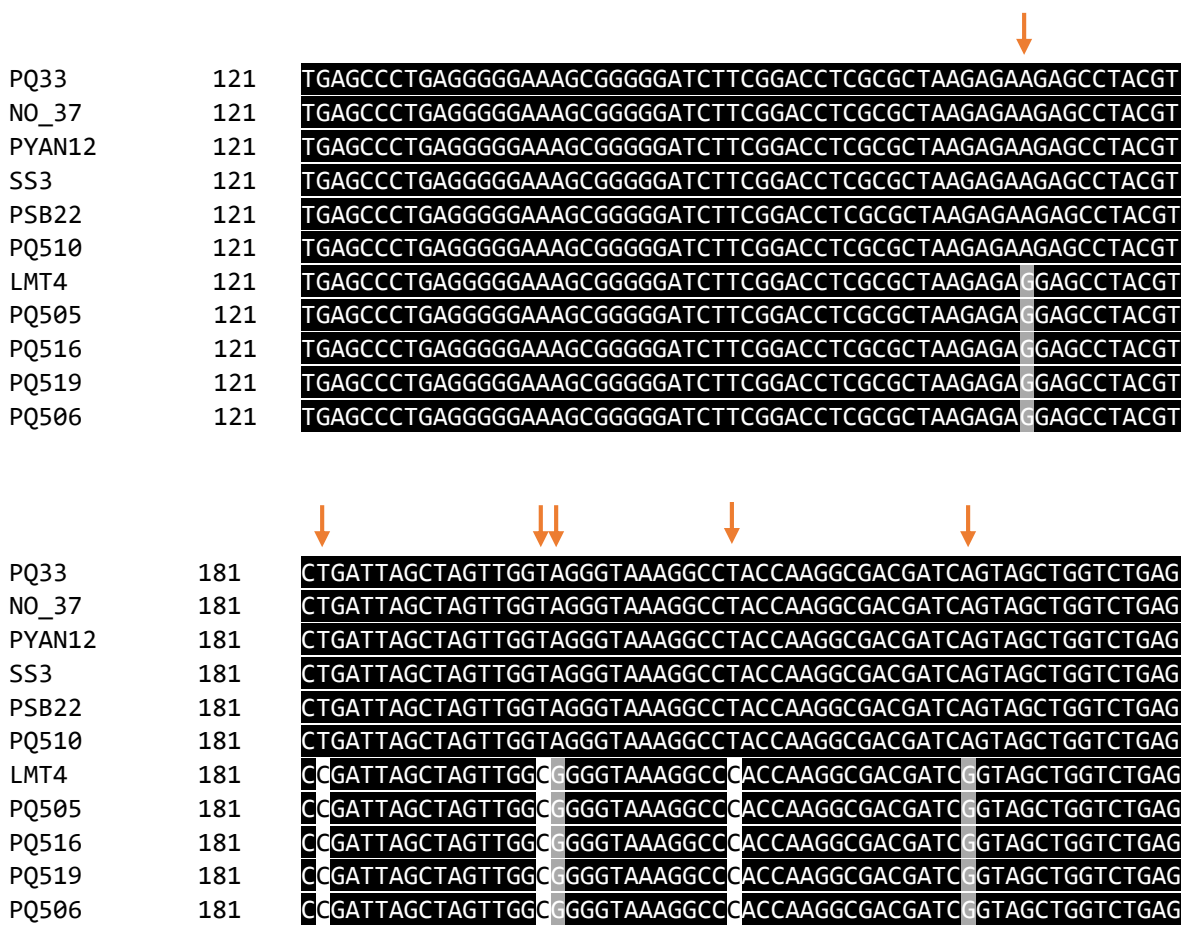


Figura 10. Alineamiento de secuencias del gen ribosomal RNA 16S de seis cepas de *At. ferrivorans* (incluidas la cepas SS3 y NO-37 como referencias) y 4 cepas de *At. ferrooxidans* (incluida la cepa LMT4 como referencia), el alineamiento muestra las posiciones variables (flecha) entre las dos especies desde el nucleótido de posición 121 hasta la posición 181.

5.5. Oxidación de hierro ferroso por *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33

Análisis adicional de oxidación de hierro ferroso a 5°C y 24°C fue realizado a la cepa *At. ferrivorans* PQ33. Se observó a 5°C una tasa de crecimiento de 0.011h⁻¹ y una tiempo de duplicación (T_d) de 66.6 ± 5.1 a pH 1.6, mientras que no se observó crecimiento a pH 2.0 (Fig. 11). Sin embargo, sí se logró visualizar la oxidación del Fe²⁺ a pH 2.0 pero a una tasa

menor que el medio con pH 1.6, donde la bacteria sí crecía exponencialmente. A diferencia a este resultado, sí se observó crecimiento y oxidación del sustrato a 24°C a ambos pH: 1.6 y 2.0 (Fig. 11).

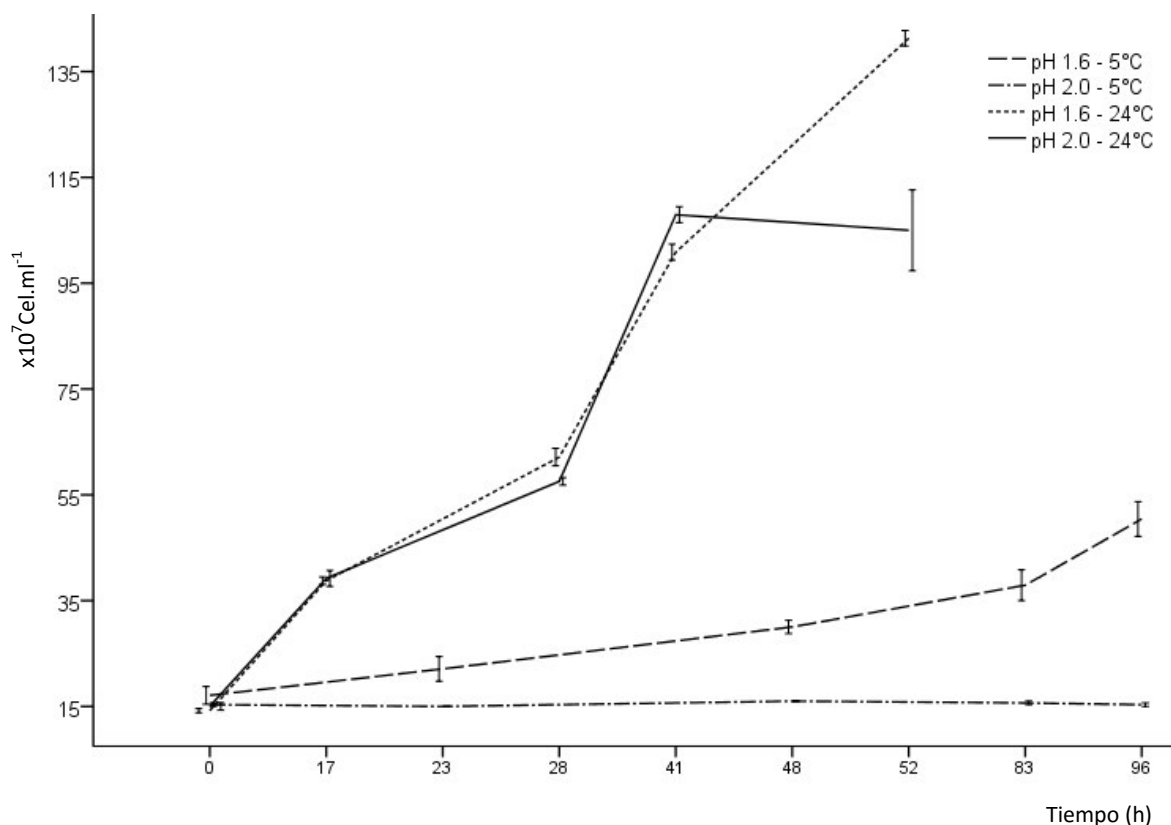


Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa PQ33 de *Acidithiobacillus* sp. en medio 9K con hierro ferroso como donante de electrones a una temperatura de 5°C. (— —) pH 1.6, (— - —) pH 2.0, a una temperatura de 24°C, (-----) pH 1.6, (—) pH 2.0.

5.6. Análisis del genoma de *At. ferrivorans* PQ33

La cepa nativa de *At. ferrivorans* PQ33 presentó un genoma de 3298172 pb y que fueron distribuidos en 101 *contigs* con un N50 de 63924 pb (Tabla 3). Se identificó 3347 genes, de los cuales, 2653 tuvieron función asignada, 3 de RNA ribosómico, 46 de RNA de transferencia y un RNA no codificante (Tabla 4). Además, el genoma presentó un 56.55% de GC (Fig. S4), similar al de *At. ferrivorans* SS3 (56.6 %) y CF27 (56.4 %) y por debajo de los ~58.8% reportado en *At. ferrooxidans*. Estos resultados muestran una mayor similitud

al genoma de *At. ferrivorans* SS3 con un operón menos de RNA ribosomal y 319 genes más, que correspondería a los 90 Kb adicionales de genoma, pero muestra una gran diferencia con *At. ferrivorans* CF27 que tendría 584 genes más y por tanto un mayor tamaño de genoma (Tabla 4).

Tabla 3. Parámetros y estadísticos del ensamblaje del genoma de *At. ferrivorans* PQ33.

Parámetros y Estadísticos	<i>At. ferrivorans</i> PQ33
# Contigs	101
# Contigs (≥ 0 pb)	101
# Contigs (≥ 1000 pb)	101
Contig más Largo	186471
Longitud Total	3298172
Longitud Total (≥ 1000 pb*)	3298172
N50	63924
N75	31917
GC (%)	56.55
No determinados	
# N's	0
# N's Per 100 Kpb	0

*contigs con tamaño mayor a 1000 pb.

Tabla 4. Comparación de las características del genoma de *At. ferrivorans* PQ33 con los de: *At. ferrivorans* SS3 y CF27, *At. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993.

Espece	<i>At. ferrivorans</i>			<i>At. ferrooxidans</i>	
	PQ33	SS3	CF27	ATCC 23270	ATCC 53993
Cepa					
Contigs	101	1	87	1	1
Total de bases	3 298 172	3 207 552	3 441 689	2 982 397	2 885 038
CDS	3347	3028	3933	2906	2755
tRNA	46	48	72	79	46
rRNA	3	6	-	6	6
Otros RNAs	1	2	1	3	2
GC%	56.5	56.6	56.4	58.8	58.9

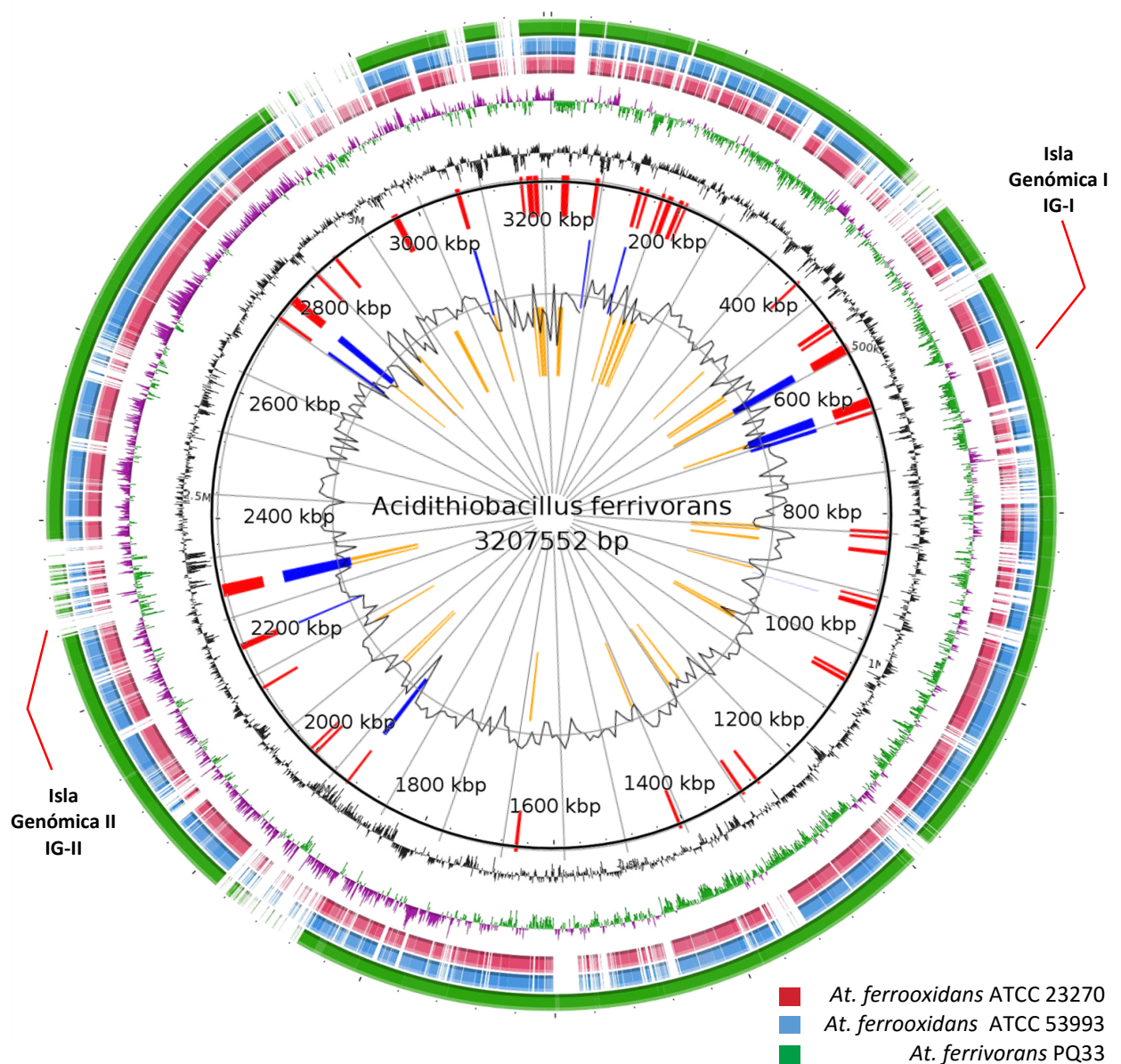


Figura 12. Alineamiento circular de genomas de *At. ferrooxidans* ATCC 23270, *At. ferrooxidans* ATCC 53993 y *At. ferrooxidans* PQ33 utilizando el genoma de *At. ferrooxidans* SS3 como referencia base (primer anillo). El porcentaje de GC (segundo anillo) se muestra de color negro. La desviación GC (tercer anillo) se muestra de color morado y verde. Los genomas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (cuarto anillo) y ATCC 53993 (quinto anillo) están de color rojo y azul respectivamente; y el genoma de la cepa nativa *At. ferrooxidans* PQ33 (sexto anillo) se muestra de color verde. Las barras amarillas representan zonas de desvío de GC y sesgo de codón; barras azules representan ubicación de genes de movilidad.

5.7. Genómica comparativa de cepas de *Acidithiobacillus* sp.

En el contexto ecológico en el que se encuentra *At. ferrivorans*, se sugiere que su genoma ha adquirido genes únicos y los ha preservado para la supervivencia a ambientes de bajas temperaturas o de resistencia a la acidez. Para comprobarlo, se realizó la comparación de los genomas de *At. ferrooxidans* y *At. ferrivorans*. Este análisis comparativo sugirió que *At. ferrivorans* SS3 posee 2 islas genómicas (IG-I y IG-II) y *At. ferrivorans* PQ33 posee 1 isla (IG-I) (Fig. 12), las cuales presentaron genes de integrasas, transposasas, endonucleasas de restricción, una desviación del GC distinto, además de genes únicos de especie para *At. ferrivorans*. La posición de la IG-I se encontró entre los 600-630 Kpb y la IG-II entre 225 a 230 Kpb con respecto al genoma de la cepa de referencia *At. ferrivorans* SS3.

Por otro lado, para verificar el grado conservativo del operón para síntesis de trehalosa en *At. ferrivorans* se realizó un alineamiento comparativo por posición de la cepa en estudio *At. ferrivorans* PQ33 contra las cepas de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 y *At. ferrivorans* CF27, utilizando el genoma completo de *At. ferrivorans* SS3 como referencia (Fig. 13). Se verificó que en la posición donde *At. ferrivorans* contiene el operón trehalosa, un *gap* en los genomas de *At. ferrooxidans* es generado a fin de que se logre alinear correctamente; además, en la región *upstream* del operón fueron visualizados un pseudogen, una proteína principal intrínseca, 3 proteínas hipotéticas y una lipoproteína. Por otro lado, en la región *downstream* se halló un pseudogen, dos proteínas hipotéticas y después de un conjunto de cinco proteínas con dominio de citocromo altamente conservado se halló dos proteínas hipotéticas, una proteína de la familia de las metalo betalactamasa y un regulador transcripcional de la familia de LysR. Estos pseudogenes y proteínas flanqueantes, a excepción de las cinco proteínas citocromo, son conservados en *At. ferrivorans* pero no en *At. ferrooxidans* (Fig. 13). Adicionalmente, desde el pseudogen *upstream* hasta el conjunto de 5 proteínas con dominio citocromo, se observó una

desviación distinta de GC. Este resultado sugiere que un evento de sintenia pudo originar al patrón de genes descrito y que el reordenamiento génico, el caso de citocromos, o una transferencia horizontal, el caso del operón de trehalosa, causó el ordenamiento actual en dicha posición del genoma en *At. ferrivorans*. Además, a causa de la estabilización de esta región, dos pseudogenes flanqueantes se produjeron en las zonas *up* y *downstream*. Por otro lado, se sugiere que la lipoproteína o las otras proteínas hipotéticas flanqueantes se encuentran involucradas en la tolerancia al frío, al igual que lo sugiere el operón de trehalosa.

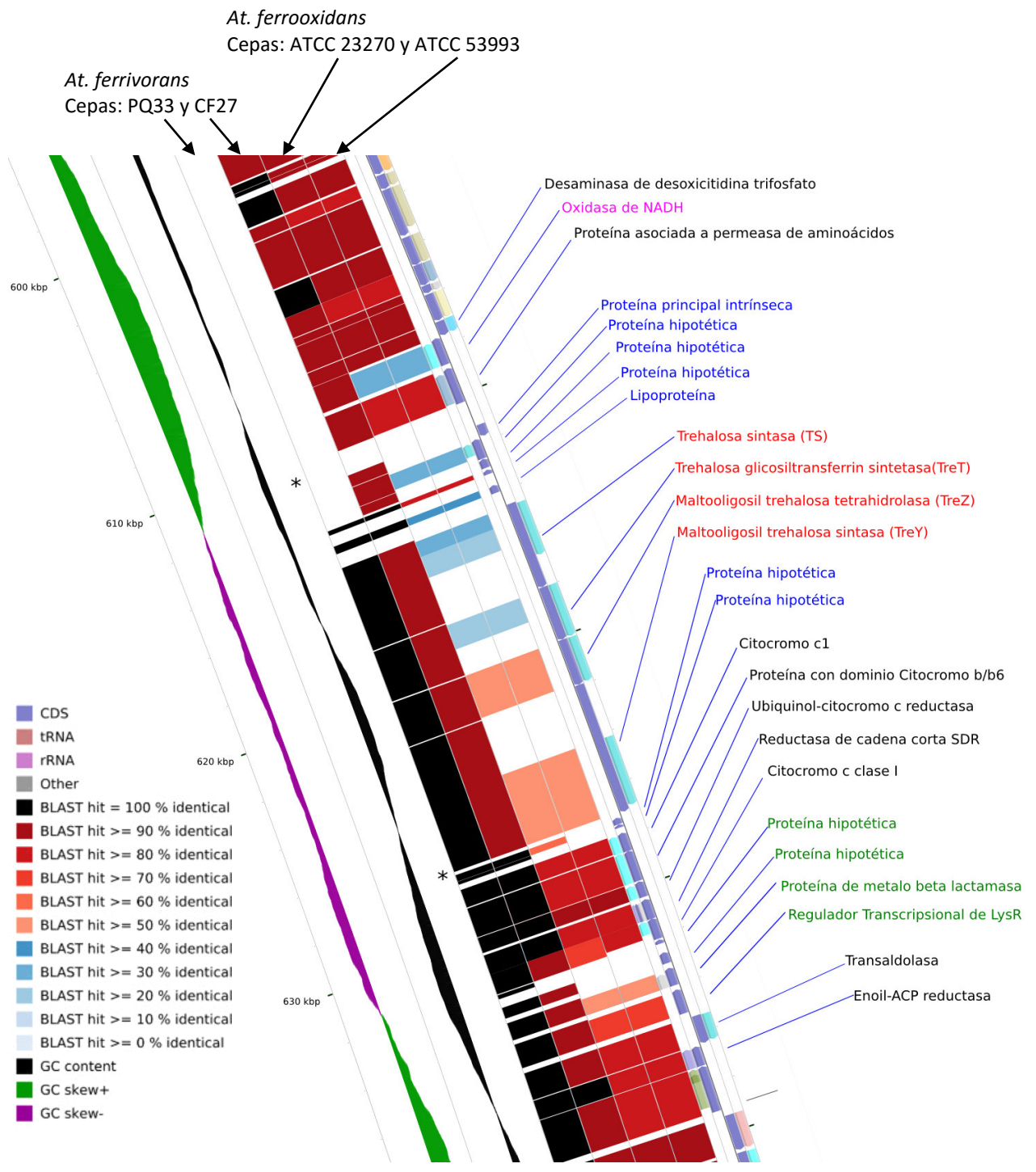


Figura 13. Análisis comparativo de las regiones flaqueantes en el operón de trehalosa utilizando como referencia el genoma de *At. ferrivorans* SS3. Formado por siete (7) arcos; la imagen es como sigue: (1) desviación GC (GC skew), (2) contenido de GC, patrones conservativos de cepas *At. ferrivorans* PQ33 (3) y CF27 (4), y de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 (5) y ATCC 53993 (6); genes son arcos azules al tope de cada gen (7). Operón trehalosa (letra roja), regiones flanqueantes poco conservadas en *At. ferrooxidans* (letra azul) y otros genes poco conservados (letras violeta y verde). *Zonas de pseudogenes.

5.8. Plasticidad del genoma de *At. ferrivorans* PQ33

Con la posibilidad de que los genes involucrados dentro de una IG sean producto de una mutación rápida o reordenamiento génico a través de la evolución, los genes dentro de la IG-I de cepas de *At. ferrivorans* fueron comparados con todos los genes contenidos en los genomas de cepas de *At. ferrooxidans*, no solo con los que se encuentran en la posición relativa de la isla o alrededor de esta. Una visualización del nivel de conservación en IG-I (Fig. 14) reveló que de los 29 genes analizados en la Isla, solo 7 genes (similitud mayor a 80%) hicieron *match* con algún gen en el genoma de *At. ferrivorans*, sin embargo, solo la transposasa pudo ser distinguida, los demás pertenecieron a genes hipotéticos (Fig. 14). Además, se halló una rusticianina con una composición aminoacídica distinta a la del operón *rus*. Por otro lado, se encontraron 2 genes únicos con dominio PilT, una peptidasa, una proteína de unión a DNA, una proteína con dominio SpoVT/AbrB y 4 endonucleasas. El hallazgo de dichos genes únicos descarta la posibilidad de reordenamiento de génico o mutación rápida y eleva la probabilidad de transferencia genética horizontal.

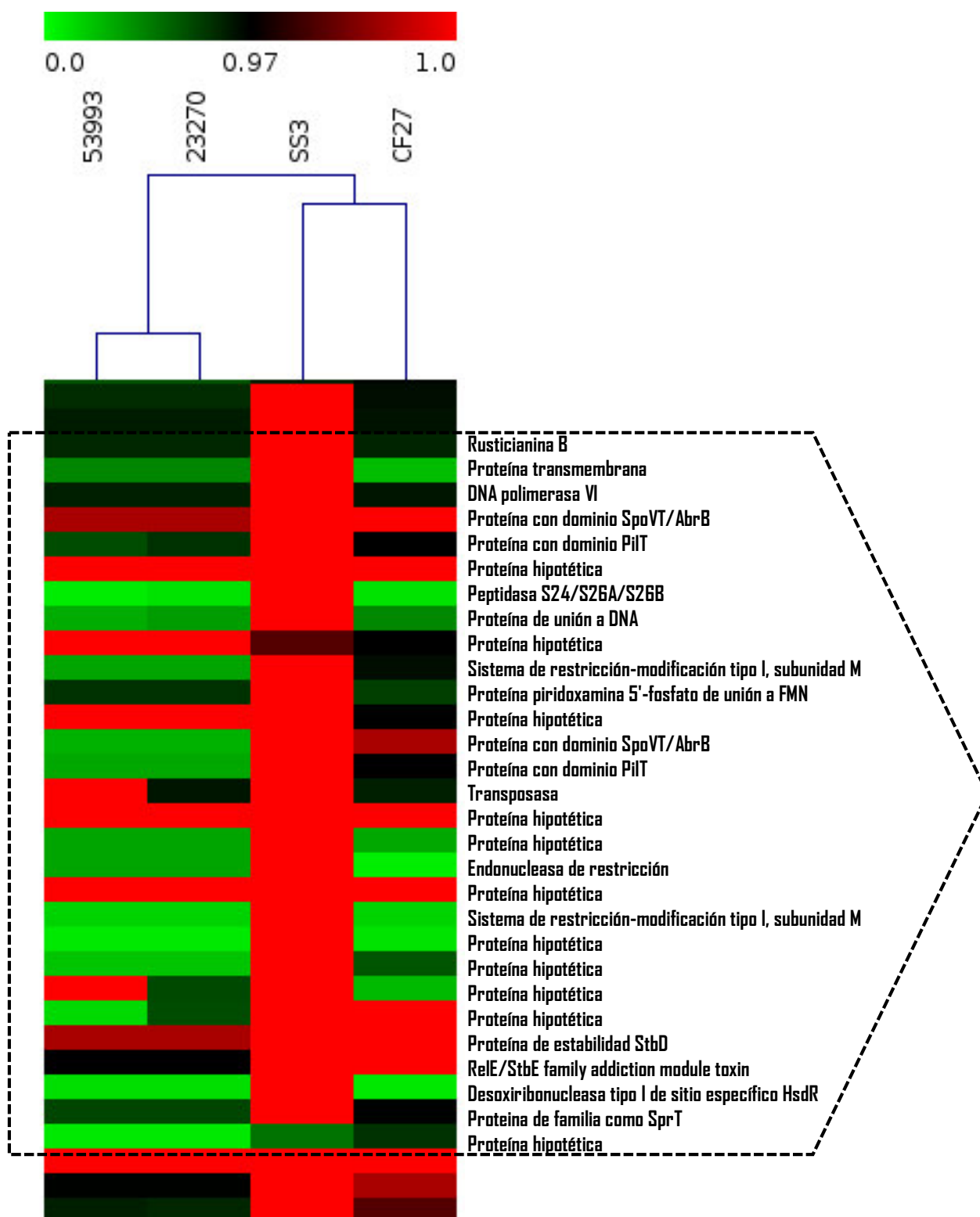


Figura 14. Grado de conservación de genes de la Isla Genómica I del genoma de *At. ferrivorans* PQ33 contra los genomas de *At. ferrooxidans* ATCC 53993, *At. ferrooxidans* ATCC 23270, *At. ferrivorans* SS3 y *At. ferrivorans* CF27. Genes con grado conservativo alto de color rojo y genes no conservados de verde.

Con el fin de probar la conservación del metabolismo de oxidación de Fe^{2+} entre *A. ferrooxidans* y *At. ferrivorans*, se evaluó el patrón de conservación a nivel nucleotídico del operón *rus* de estas dos especies (Fig. 15). El alineamiento mostró un patrón conservado entre cepas de la misma especie para las dos especies respectivamente, pero la posición y sentido de expresión de genes fue conservado en las cuatro cepas. Por otro lado, se observó que las regiones flanqueantes *upstream* al operón no fueron conservadas entre las cepas de *At. ferrivorans*, como sí lo fueron entre cepas de *At. ferrooxidans*. Además, se encontró *gaps* en la región anterior y posterior al gen de rusticianina que equivaldría a pérdidas de 100 nucleótidos en la región *upstream* de *At. ferrooxidans* y un pérdida de 800 nucleótidos en la región *downstream* de *At. ferrivorans* (Fig. 15). Tales patrones conservados de *gaps* en los genomas de ambas especies pueden ser útiles para la identificación de especie.

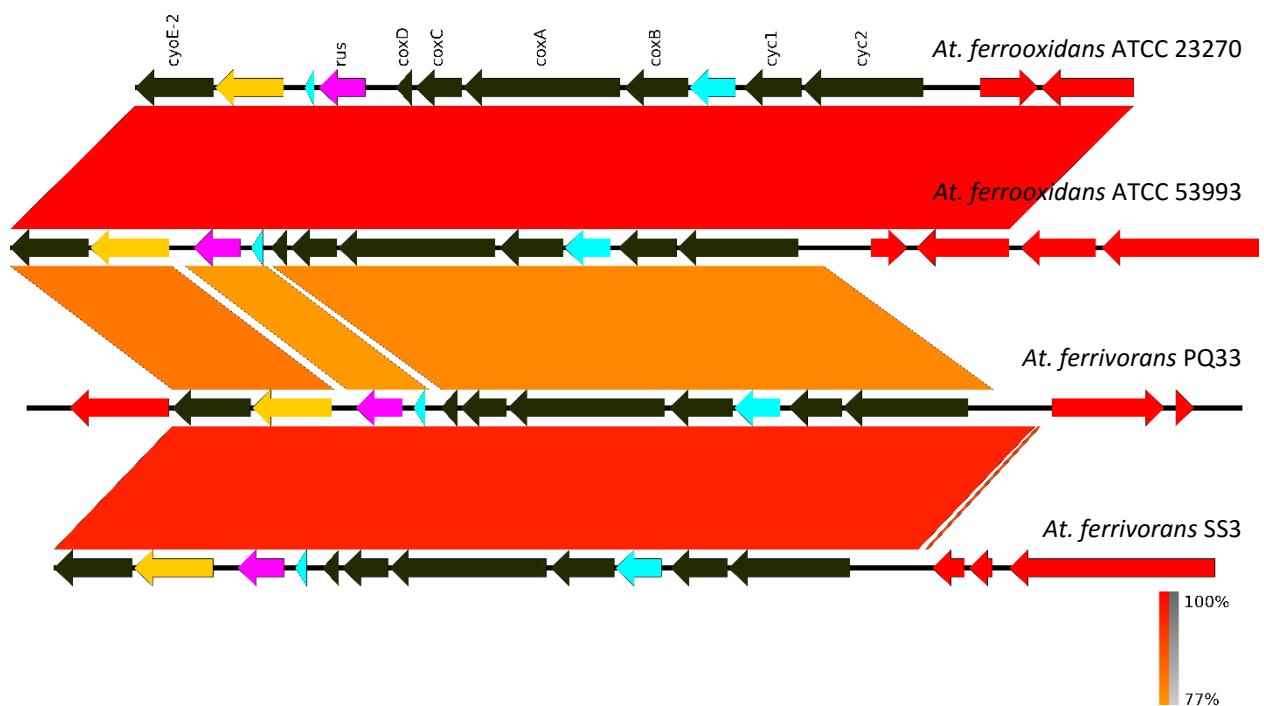


Figura 15. Alineamiento del operón *rus* de *At. ferrooxidans* ATCC 23270, *At. ferrooxidans* ATCC 53993, *At. ferrivorans* PQ33 y *At. ferrivorans* SS3. Los genes directamente involucrados en la oxidación del Fe^{2+} se encuentran de color verde y rosado. Genes no involucrados se colorean de rojo; genes putativos de color amarillo y genes hipotéticos de color celeste.

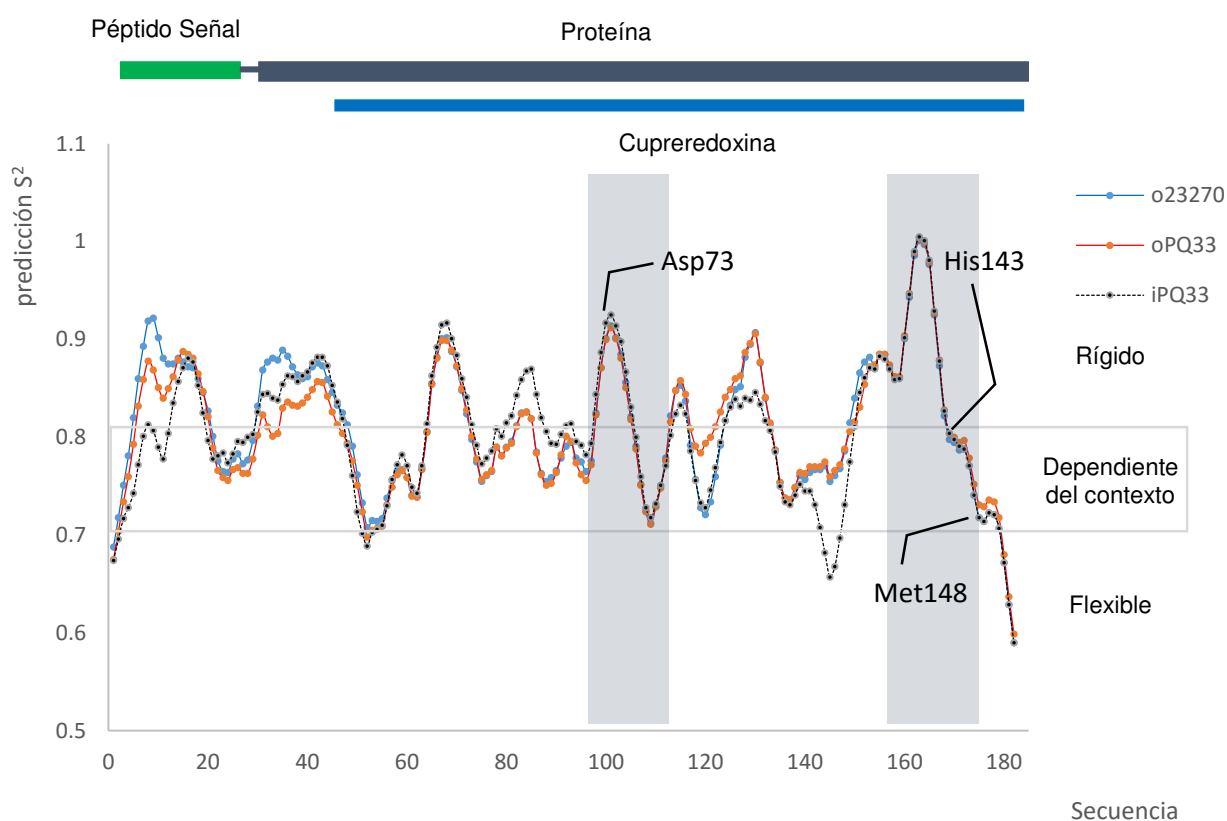


Figura 16. Flexibilidad de proteínas Rus de los operones *rus* (RusA) de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 (azul, o23270) y *At. ferrivorans* PQ33 (rojo, oPQ33) y de la Isla Genómica I (RusB) de PQ33 (negro interlineado, iPQ33). Predicción S2 en función de la secuencia de aminoácidos. Patrones de conservación en las 3 rusticianinas están sombreados de color plomo, que coincide con los aminoácidos clave en la estructura de rusticianina: Asp73, His143 y Met148 (según Patra *et al.*, 2013).

5.9. Flexibilidad comparativa *in silico* de proteínas de membrana

Por la capacidad de *At. ferrivorans* PQ33 de oxidar el Fe^{2+} y el CuS a 5°C a un rendimiento mejor al de *At. ferrooxidans*, se sugiere que las proteínas involucradas en el proceso de oxidación deben funcionar mejor en *At. ferrivorans* psicrotolerante que en *At. ferrooxidans* mesófilo cuando las dos especies se encuentran creciendo y oxidando a las mismas condiciones de bajas temperaturas. A fin de comprobar esto, la flexibilidad de las proteínas rusticianina y sulfuro quinona reductasa fue comparada *in silico*. La comparación mostró que la proteína rusticianina de la IG-I (RusB) tuvo mayor flexibilidad que las de los operones

rus (RusA) de *A. ferrooxidans* y *At. ferrivorans* (Fig. 16), y entre las proteínas de RusA de los operones, la de *At. ferrivorans* mostró mayor flexibilidad. Por otro lado, la sulfuro quinona reductasa también mostró mayor flexibilidad en *At. ferrivorans* que en *At. ferrooxidans* (Fig. S5). La composición de aminoácidos distinta provoca una mayor flexibilidad de proteínas de membrana que compensaría la pérdida de entropía al disminuir la temperatura. Estos resultados sugieren un mejor performance sobre la capacidad oxidativa a bajas temperaturas por parte de la bacteria psicotolerante *At. ferrivorans*.

VI. DISCUSIÓN

6.1. Oxidación de Fe^{2+} y CuS a 5°C

A pesar de que *Acidithiobacillus ferrivorans* ha sido catalogada como una especie psicrotolerante que puede crecer y oxidar hierro ferroso y compuestos inorgánicos reducidos azufrados (RISCs) a 5°C (Kupka *et al.*, 2009), las cepas cuya fisiología se ha descrito hasta el momento, SS3 (Kupka *et al.*, 2007), CF27 (Talla *et al.*, 2013) y ACH (Barahona *et al.*, 2014) no pueden crecer a un pH menor al de 1.7 y además, poseen un tiempo de duplicación mayores a 58 horas. A la temperatura de 5°C , la cepa PQ33, puede alcanzar un tiempo de duplicación de 64 horas a un pH de 1.6, el cual sería enormemente útil al realizar procesos de biolixiviación, ya que permite alcanzar un mayor número de células por ml y la formación limitada de jarosita y schwertmanita, como se ha reportado para cepas de *At. ferrooxidans* (Daoud *et al.*, 2006). Sin embargo, esta cepa no se duplica exponencialmente a un pH de 2.0 a 5°C aunque la concentración de hierro férrico sí aumenta, pero no lo hace a la misma velocidad que creciendo a un pH de 1.6, ya que a este pH la bacteria sí se duplica exponencialmente. Según los reportado, la velocidad de oxidación aumenta conforme aumenta el pH del medio (Daoud *et al.*, 2006; Kupka *et al.*, 2007), pero este patrón no se cumple para el crecimiento de *At. ferrivorans* PQ33 a 5°C , en donde al pasar de pH 1.6 a 2.0 no aumenta la velocidad de oxidación del hierro ferroso. Sin embargo, el hecho de que PQ33 pueda oxidar Fe^{2+} a pH 2.0, a pesar de no duplicarse, obedece a un comportamiento particular que no se ha reportado en estudios anteriores. Dicho comportamiento obedecería a una velocidad de oxidación rápida sin destinar energía a la generación de biomasa, teniendo en cuenta que el número de células no incrementa considerablemente. Por otro lado, a temperatura ambiente en ambos pH 1.6 y 2.0, la generación de biomasa iba acompañada de la oxidación del Fe^{2+} ; tal como ocurrió pH de 1.6 a 5°C (Fig. 11).

La biolixiviación de sulfuro de cobre a bajas temperaturas no se ha descrito anteriormente para ninguna bacteria, ni siquiera por alguna del género *Acidithiobacillus*. Aunque Sakaguchi *et al.* (1976) reportaron que la solubilización de cobre se favorece a una temperatura de 35°C cuando se realiza un proceso de biolixiviación en medio 9K libre de hierro ferroso; ellos también determinaron una dependencia de la bacteria a la temperatura de incubación, mientras más baja es la temperatura de incubación, menor solubilización de CuS (Sakaguchi *et al.*, 1976). En nuestros resultados se ha conseguido la biolixiviación de cobre a baja temperatura. Utilizando la cepa PQ33, la cantidad total de Cu²⁺ solubilizado a 5°C fue del 40% (Fig. 7); aunque fue menor al reportado por Dong *et al.* (2013), quienes obtuvieron 46% de extracción de cobre a 24°C con *At. ferrooxidans*, y donde tampoco agregaron hierro ferroso inicial, nuestro estudio con *At. ferrivorans* PQ33 es el único reporte de la oxidación de sulfuro de cobre a bajas temperaturas y esto lo convierte en un resultado importante. Además, a pesar de que *At. ferrivorans* PQ33 alcanzó una biomasa de 6.4×10^8 células/ml a 5°C a los 15 días de crecimiento, no se observó cualitativamente la lixiviación de cobre hasta este tiempo. Sand *et al.* (2001) habían descrito que en la biolixiviación de sulfuros metálicos se genera azufre elemental, pero este azufre es luego convertido a sulfato por la misma bacteria. Es probable que durante los primeros 15 días, parte de la energía obtenida por *At. ferrivorans* PQ33 no fue por lixiviación directa de CuS; sino, obtenida por lixiviación de los polisulfuros intermedios generados (Cherney *et al.*, 2012). Por otro lado, PQ33 pudo adaptarse a 5°C después de varios reinóculos, a diferencia de *At. ferrooxidans* PQ506 que no se logró adaptar y la concentración de cobre liberado por la bacteria fue casi imperceptible; lo cual contribuye al desarrollo de sistemas que utilicen *At. ferrivorans* para biolixiviación a bajas temperaturas.

El tiempo de duplicación de *At. ferrivorans* PQ33 en CuS es un resultado inédito, a pesar de ser un sustrato insoluble, se halló un tiempo de ~64h, cercano al de un cultivo con hierro ferroso soluble (~67h). Además, entre los dos tipos de medio había una diferencia de pH de 2,5 para CuS y 1,6 para el medio con Fe²⁺. Esta velocidad similar de crecimiento sugiere

que *At. ferrivorans* tendría contacto directo con el CuS. Sin embargo, no se observó formación de capsulas coloidales ni biopelícula a bajas temperaturas, al contrario de a temperatura ambiente. Se sugiere que a un pH de 2,5 para *At. ferrooxidans*, las cargas negativas de la membrana le permitirían la atracción electrostática con el mineral (Wang *et al.*, 2012), pero esta atracción con el mineral no se observó en *At. ferrivorans*. Barahona *et al.* (2014) demostraron que una bacteria de *At. ferrivorans* ACH podía desarrollar exopolisacáridos a una temperatura de 10°C durante su crecimiento en pirita y que no había diferencia en cuanto al crecimiento a temperatura ambiente, sin embargo, es probable que *At. ferrivorans* no pueda generar tales exopolisacaridos a 5°C, lo que le imposibilitaría formar una biopelícula alrededor del CuS, sin embargo, hacen falta más estudios con respecto a la formación de biopelículas a temperaturas de 5°C o menores. Por otro lado, a temperatura ambiente, al igual que las cepas ACH y PQ33 de *At. ferrivorans*, la cepas PSB22 y PYAN12, también de *At. ferrivorans*, mostraron formación de biopelícula alrededor de granos de CuS a temperatura ambiente, sugiriendo que la especie posee este carácter conservado.

6.2. Genes implicados en la tolerancia al frío

At. ferrivorans PQ33 presentó helicasas de RNA con motivo DEAD/H-box, similar al sistema de respuesta para adaptación al frío de *Bacillus subtilis* (Hunge *et al.*, 2006), sugiriendo que dichas proteínas, en PQ33, pueden destruir las estructuras secundarias de RNA, que se forman desfavorablemente a bajas temperaturas (Lorsch *et al.*, 2002). Por otro lado, como estrategia de adaptación al clima frío, PQ33 presenta genes desturasas de ácido fático (Phadtare y Inouye, 2008) que incrementarían la fluidez de membrana como ya lo han reportado Liljeqvist *et al.* (2015) en metagenomas de comunidades de *Acidithiobacillus* sp. tolerantes a bajas temperaturas. Además, al igual que en las cepas *At. ferrivorans* SS3 y CF27, PQ33 tendría el mismo sistema de adaptación al frío al presentar los cuatro genes de trehalosa (TPS, TreZ, TreY y TreT) (Liljeqvist *et al.*, 2011). La presencia del operón de trehalosa en todas las especies de *At. ferrivorans* reportadas hasta el

momento, y su patrón conservado, refuerzan la posibilidad de que *At. ferrivorans* utilice la trehalosa para prevenir la agregación de proteínas y su consecuente desactivación, o aumentar la viscosidad del citoplasma para evitar la formación de cristales (Jain y Roy, 2009). Otra estrategia para evitar la agregación de proteínas, pero cuando estas acaban de ser sintetizadas en el ribosoma, puede ser prevenido con 5 genes de peptidil prolil cis-trans isomerasas (PPlasas) que presenta *At. ferrivorans* PQ33. Estas estarían involucradas en la última etapa del plegamiento de proteínas, ya que su actividad de isomerización es necesaria para alcanzar el estado nativo (Budiman *et al.*, 2011). En contraste, *At. ferrooxidans* solo posee 3 de estas proteínas PPlasas.

En cuanto a las Islas Genómicas, la mayoría de los genes únicos implicaban genes hipotéticos. Sin embargo, el hallazgo de dos proteínas con dominio pilT y con secuencia de aminoácidos distinta a otras proteínas pilT que son conservados en *At. ferrooxidans*, posiblemente implicadas en adherencia (Li y Li, 2014; Zhang *et al.*, 2008), hace pensar en la posibilidad de que estén involucradas en alguna función adicional diferente a la adherencia a sulfuros sólidos a bajas temperaturas, movilización o de nanocables para el transporte de electrones (Li y Li, 2014).

6.3. Rusticianina en una Isla Genómica

Si bien se ha reportado que *At. ferrooxidans* puede crecer a bajas temperaturas, este crecimiento es lento ($t_d > 100h$), necesita un proceso largo de adaptación y es necesario un medio enriquecido de Fe^{2+} (Berthelot *et al.*, 1993; Leduc *et al.*, 1993). Por el contrario, *At. ferrivorans* presenta altas velocidades de crecimiento a 5°C ($t_d > 50h$) en medio 9K estándar (33.3% Fe^{2+}). A pesar de que las dos especies poseen los operones *pet* y *rus* intactos, involucrados directamente con la oxidación de Fe^{2+} , *At. ferrivorans* posee dos rusticianinas extra en el genoma, las cuales son poco comunes en *At. ferrooxidans* mesófilos. Una de las rusticianinas en PQ33, a pesar de encontrarse cercana a una isla genómica, zona altamente variable, se ha preservado al igual que en las cepas SS3 y CF27 de *At. ferrivorans*. Esto implica que la Rus de IG-I (RusB) tiene una función clave dentro de *At.*

ferrivorans. Por otro lado, la flexibilidad de Rus muestra zonas conservadas alrededor de los aminoácidos Asp73 e His143 (Fig. 16). Estos podrían jugar un rol importante en la unión con la citocromo c (Cyc2) y en la unión con la citocromo c₄ (Cyc1), respectivamente según el análisis de dinámica molecular de Patra *et al.* (2013). Estos resultados sugieren que RusB interactúa con Cyc2 y Cyc1 de forma similar a lo que lo hace RusA, preservándose así su funcionalidad en la cadena transportadora de electrones. Por otro lado Sepunaru *et al.* (2012) habían determinado una correlación directa entre conductividad eléctrica y la temperatura en proteínas de bacteriorodopsina; adicionalmente, Kubisz y Marzec (2002) demostraron que proteínas como el colágeno y la queratina podrían elevar su conductividad eléctrica cuando se aumentaba la temperatura de ensayo. Estos resultados sugieren que la mayor flexibilidad de la proteína RusB le permitiría compensar la pérdida de energía por la disminución de la entropía cuando la bacteria crece a 5°C, a fin de que no pierda su capacidad conductora. Por esto último, cabe la posibilidad de un reemplazo de la Rus del operón (RusA) por RusB cuando *At. ferrivorans* crece a bajas temperaturas; lo cual mejoraría su *fitness* (en contraste con *At. ferrooxidans*) para poder oxidar Fe²⁺ y crecer a una velocidad mayor a la que lo hace *At. ferrooxidans* a 5°C.

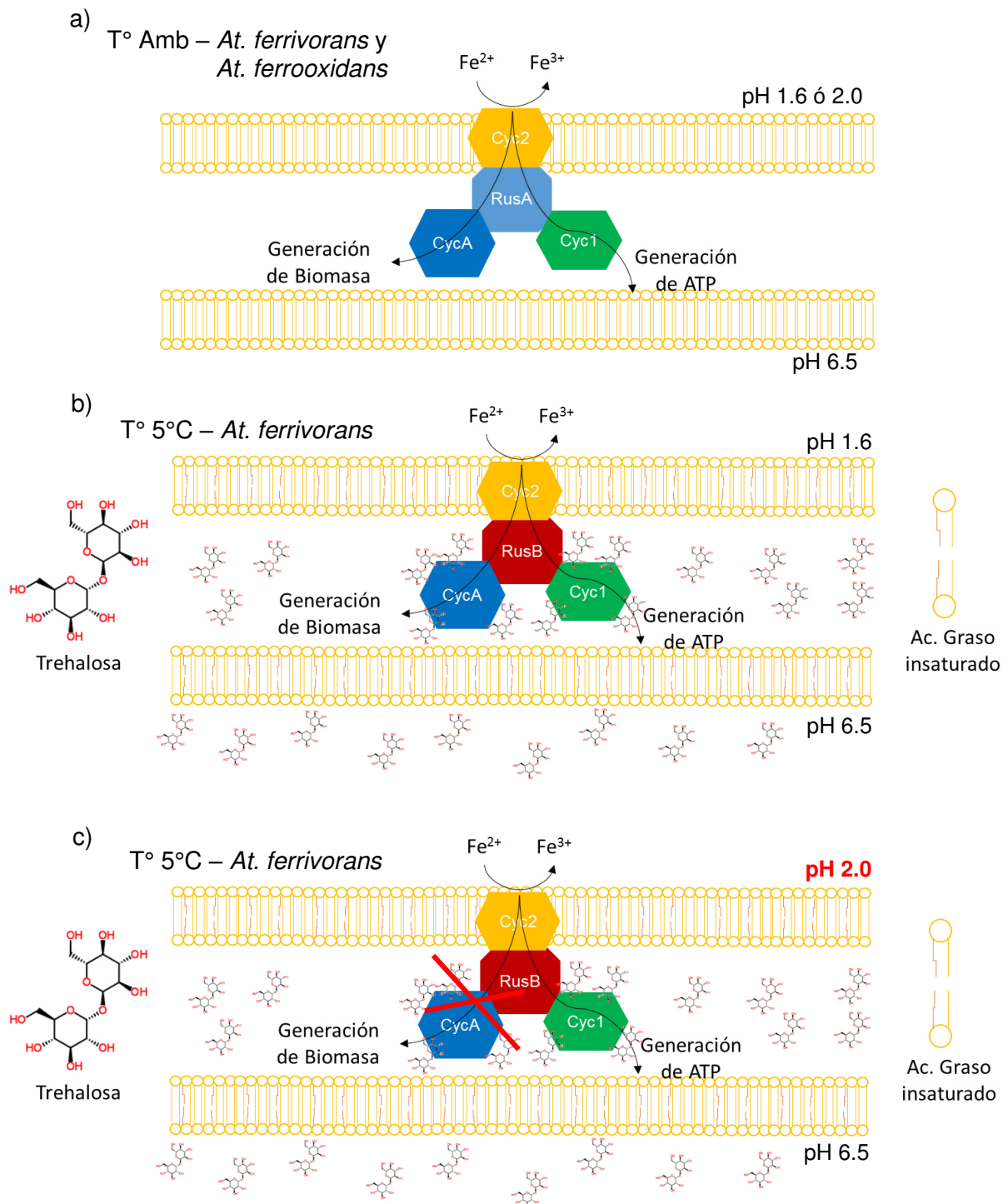


Figura 17. Diagrama hipotético de las vías *uphill* y *downhill* de *At. ferrooxidans* y *At. ferrivorans*. El electrón, tomado por Cyc2 desde Fe²⁺, es dirigido por Rus hacia CycA *uphill* para generación de biomasa o hacia Cyc1 *downhill* para generación de ATP. A 24°C (a), el switch RusA cede electrones hacia ambas vías para las dos especies. A 5°C (b y c), RusA es reemplazado por RusB en *At. ferrivorans*. Sin embargo, RusB no cede electrones a CycA a pH 2.0 y 5°C (c).

En el modelo oxidativo de Quatrini *et al.* (2009), la proteína Rus sería el interruptor (*switch*) para elegir una de las vías, vía *downhill* o vía *uphill*, para el consumo de electrones a partir de Fe^{2+} y que están destinados a la generación de biomasa o la generación de ATP respectivamente. Utilizando este modelo base, se propone un nuevo modelo para *At. ferrivorans* PQ33 en el cual se establece que por la capacidad de *At. ferrivorans* PQ33 de crecer en Fe^{2+} a pH de 1.6 (24°C y 5°C) y 2.0 (24°C) pero no poder hacerlo a pH 2.0 a 5°C, se sugiere el reemplazo de RusB (baja temperatura) por RusA (temperatura ambiente). Esta proteína RusB bloquearía o desviaría el flujo de electrones hacia la vía *uphill* (a pH 2,0 y T° 5°C) e imposibilitaría la generación de biomasa, ya que esta sí se puede generar velozmente al mismo pH pero a 24°C, donde estaría expresándose RusA normal. Por otro lado, a pH 1.6 y 5°C, habría un cambio conformacional en la proteína RusB que permitiría el paso de los electrones hacia la vía *uphill* para generar biomasa (Fig. 17). Este cambio de la proteína RusB estaría generado por una presión de los electrones, impulsados por la diferencia de pH entre el medio externo (1.6) e interno (6.5). Además, el reemplazo de RusB por RusA beneficiaría la conductividad eléctrica debido al mayor dinamismo intrínseco de la proteína RusB. Sin embargo, la hipótesis de si RusB reemplaza a RusA aún debe ser evaluada experimentalmente. Adicionalmente, algunos fosfolípidos con ácidos grasos insaturados, la trehalosa, Helicasas de RNA, PPlasas y proteínas de shock térmico deberían estar siendo sintetizados por la bacteria (Fig. 17). De esta manera, la membrana plasmática, el citoplasma, la expresión génica y las proteínas encargadas del proceso oxidativo estarían siendo crioprottegidos.

VII. CONCLUSIONES

1. *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 crece en hierro ferroso (Fe^{2+}) con un tiempo de duplicación de $66,6 \pm 5,1$ h a una temperatura de 5°C a pH 1.6, que la convierte en la primera cepa de *At. ferrivorans* que es capaz de crecer por debajo de pH 1.7, con potencial aplicación en procesos de biolixiviación sin formación de jarosita.
2. *At. ferrivorans* PQ33 crece a un tiempo de duplicación de $63,6 \pm 3,9$ h en sulfuro de cobre (CuS) al 0.5% a una temperatura de 5°C ; tiene un significado importante para el desarrollo de la biolixiviación a gran altura, como en los Andes peruanos.
3. El genoma de *At. ferrivorans* tiene un tamaño de 3298172 pb con un contenido de 56.55% de GC y 3347 genes, de los cuales, 2653 tienen función conocida, 3 son de RNA ribosómico, 46 de RNA de transferencia y 1 de RNA no codificante.
4. La cepa *At. ferrivorans* PQ33 contiene el operón de trehalosa conservado y posee 5 genes de peptidil prolil cis-trans isomerasas (PPIasas) para prevenir la agregación de proteínas no nativas.
5. *At. ferrivorans* PQ33 mostró plasticidad de genoma al poseer una Isla Genómica que contiene el gen *rus* que expresaría una rusticianina B que permitiría un mejor *fitness* psicotolerante.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEXEYENKO A, TAMAS I, LIU G, and SONNHAMMER E. Automatic clustering of orthologs and inparalogs shared by multiple proteomes. *Bioinformatics* 2006, 22 (14): e9-e15

ALIKHAN NF, PETTY NK, BEN NL, BEATSON SA: BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 2011, 12:402.

APWEILER,R. et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32: D115–D119.

ASSEFA S, KEANE TM, OTTO TD, NEWBOLD C, BERRIMAN M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics.* 2009;25(15):1968-1969.

AVONCE N, MENDOZA-VARGAS A, MORETT E, ITURRIAGA G: Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol Biol* 2006, 6:109-123.

BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology.* 2012;19(5):455-477.

BARAHONA S, DORADOR C, ZHANG R, AGUILAR P, SAND W, VERA M, REMONSELLEZ F. Isolation and characterization of a novel *Acidithiobacillus ferrivorans* strain from the Chilean Altiplano: attachment and biofilm formation on pyrite at low temperature. *Res Microbiol.* 2014;165(9):782-93

BARAHONA, S., DORADOR C., ZHANG R., AGUILAR P., SAND W., VERA M., REMONSELLEZ F., Isolation and characterization of a novel *Acidithiobacillus ferrivorans* strain from the Chilean Altiplano: attachment and biofilm formation on pyrite at low temperature, *Research in Microbiology* 2014, 165(9): 782-793.

BARRETT M, IAN HARVEY, SUNDARARAJAN M, SURENDRAN R, HALL J, ELLIS MJ, HOUGH M, STRANGE RW, HILLIER IH, and HASNAIN S. Atomic Resolution Crystal Structures, EXAFS, and Quantum Chemical Studies of Rusticyanin and Its Two Mutants Provide Insight into Its Unusual Properties. *Biochemistry* 2006, 45 (9), 2927-2939.

BERTHELOT D, LEDUC LG, FERRONI GD. Temperature studies of ironoxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs isolated from uranium mines. *Can J Microbiol* 1993 39:384–388.

BONNEFOY V and HOLMES DS, Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology* 2012, 14: 1597–1611.

BUDIMAN C, KOGA Y, TAKANO K, KANAYA S. FK506-Binding Protein 22 from a Psychrophilic Bacterium, a Cold Shock-Inducible Peptidyl Prolyl Isomerase with the Ability to Assist in Protein Folding. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(8):5261-5284.

CAMACHO C. BLAST+ Release Notes. 2015 May 6. In: BLAST® Help. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008.

CAMACHO,C. et al. BLASTp: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009, 10, 421.

CAMERON R A, YEUNG C W, GREER C W, GOULD W D, MORTAZAVI S, BÉDARD P L, MORIN L, LORTIE L, DINARDO O, KENNEDY K J. The bacterial community structure during bioleaching of a low-grade nickel sulphide ore in stirred-tank reactors at different combinations of temperature and pH [J]. *Hydrometallurgy*, 2010, 104(2): 207–215.

CASTELLE C, GUIRAL M, MALARTE G, et al. A New Iron-oxidizing/O₂-reducing Supercomplex Spanning Both Inner and Outer Membranes, Isolated from the Extreme

Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The Journal of Biological Chemistry. 2008;283(38):25803-25811.

CHEN L, REN Y, LIN J, LIU X, PANG X. *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant. PLoS One 2012, 7:e39470.

CHENNA R, SUGAWARA H, KOIKE T, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Research. 2003;31(13):3497-3500.

CHERNEY, MAIA M., ZHANG Y, JAMES M, WEINER J, Structure–activity characterization of sulfide:quinone oxidoreductase variants, Journal of Structural Biology 2012, 178(3) 319-328.

Chu V., Gottardo R, Raftery A, Bumgarner R and Yeung K. MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. Genome Biology 2008, 9:R118.

CILIA E, PANCSA R, TOMPA P, LENAERTS T, VRANKEN WF. From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. Nat Commun. 2013;4:2741.

DAOUD, J. Y D. KARAMANEV. Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Miner. Eng. 2006, 19, 960–967

DHILLON BK., CHIU T, LAIRD M, LANGILLE M, AND BRINKMAN F. IslandViewer update: improved genomic island discovery and visualization. Nucl. Acids Res 2013, 41:W129-32

DONG, YINGBO, LIN, HAI, XU, XIAOFANG, ZHOU, SHANSHAN, Bioleaching of different copper sulfides by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its adsorption on minerals, Hydrometallurgy 2013, 140:42-47.

EDDY S.R. Accelerated profile HMM searches. PLoS Comput 2011. Biol., 7, e1002195.

ESCOBAR, B., S. BUCCICARDI, G. MORALES, J. WIERTZ, Biooxidation of ferrous iron and sulphide at low temperatures: Implications on acid mine drainage and bioleaching of sulphide minerals, *Hydrometallurgy* 2010, 104(3-4):454-458.

FUKUMORI Y, YANO T, SATO A & YAMANAKA T. Fe(II) oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbial Lett* 1988, **50**: 169-172.

GERICKE M, PINCHES A, VAN ROOYEN J V. Bioleaching of a chalcopyrite concentrate using an extremely thermophilic culture. *J Int Miner Process*, 2001, 62: 243–255.

GRANT JR, ARANTES AS, STOTHARD P: Comparing thousands of circular genomes using the CGView comparison tool. *BMC Genomics* 2012, 13:202.

GUREVICH A, SAVELIEV V, VYAHHI N, TESLER G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075.

HAFT D.H. et al. TIGRFAMs and genome properties in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013, 41, D387–D395.

HALLBERG K.B., GONZÁLEZ-TORIL E., JOHNSON D.B. *Acidithiobacillus ferrivorans* sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant, iron- and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles*. 2010;14:9–19.

HAUSMANN R, HIDALGO CA, BUSTOS S, COSCIA M, CHUNG S, JIMENEZ J, SIMOES A, YILDIRIM M. The Atlas of Economic Complexity. Puritan Press. Cambridge MA. (2011).

HUNGER K, BECKERING CL, WIEGESHOFF F, GRAUMANN PL, MARAHIEL MA. Cold-Induced Putative DEAD Box RNA Helicases CshA and CshB Are Essential for Cold Adaptation and Interact with Cold Shock Protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(1):240-248.

HYATT,D. et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 2010, 11, 119.

JAIN NK, ROY I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2009;18(1):24-36.

KANDROR O, DELEON A, GOLDBERG AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:9727–9732.

KOLBE D.L. AND EDDY S.R. Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics* 2011, 27, 3102–3109.

KUBISZ L., MARZEC E. Studies on the temperature dependence of electrical conductivity of solid-state proteins. *FEMS Microbiology Letters* 50, 1988 169-172

KUPKA D, LILJEQVIST M, NURMI P, PUHAKKA JA, TUOVINEN OH, DOPSON M. Oxidation of elemental sulfur, tetrathionate, and ferrous iron by the psychrotolerant *Acidithiobacillus* strain SS3. *Res Microbiol*. 2009;160:767–774.

KUPKA D., RZHEPISHEVSKA O. I., DOPSON M., LINDSTRÖM E. B., KARNACHUK O. V. AND TUOVINEN, O. H, Bacterial oxidation of ferrous iron at low temperatures. *Biotechnol. Bioeng*. 2007, 97: 1470–1478.

LAGESEN K, HALLIN P, RODLAND EA, STAERFELDT HH, ROGNES T, USSERY DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 2007, 35(9):3100–3108.

LEDUC LG, TREVORS JT, FERRONI GD. Thermal characterization of different isolates of *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 1993, 108:189–194.

LI, Y. and LI, H., Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* can transfer electrons from extracellular electron donors. *J. Basic Microbiol*. 2014, 54: 226–231.

LILJEQVIST M, RZHEPISHEVSKA OI, DOPSON M. Gene Identification and Substrate Regulation Provide Insights into Sulfur Accumulation during Bioleaching with the

Psychrotolerant Acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans*. Applied and Environmental Microbiology. 2013;79(3):951-957.

LILJEQVIST, M, OSSANDON F, GONZÁLEZ C, RAJAN S, STELL A, VALDES J, HOLMES D, DOPSON M. Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. FEMS Microbiology Ecology Apr 2015, 91 (4)

LILJEQVIST, M, VALDES J, HOLMES D AND DOPSON M. Draft Genome of the Psychrotolerant Acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3. Journal of Bacteriology 2011, 193(16): 4304-4305.

LILJEQVIST, M. Genomics, Physiology, and Applications of Cold Tolerant Acidophiles. 2012, ISBN: 978-91-7459-472-0.

LIN S-H, LIAO Y-C. CISA: Contig Integrator for Sequence Assembly of Bacterial Genomes. Watson M, ed. PLoS ONE. 2013;8(3):e60843.

LORSCH, J. R. RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. Cell 2002, 109:797-800.

LOWE TM, EDDY SR: tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res 1997, 25(5):955–964.

MANGOLD S, VALDES J, HOLMES DS, DOPSON M. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. Front. Microbiology 2011, 2:17.

OLSON G.J., J.A. BRIERLEY, C.L. BRIERLEY. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. Applied Microbiology and Biotechnology 2003, 63:249–257.

PATRA MC, KUMAR S, NARAYAN S, AND MAHARANA J, Structural Analysis of Respirasomes in Electron Transfer Pathway of *Acidithiobacillus ferrooxidans*: A

Computer-Aided Molecular Designing Study, ISRN Biophysics 2013, 2013, Article ID 295718, 14 pages.

PHADTARE S & INOUE M. Cold-shock proteins. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology (Margesin R, Schinner F, Marx J-C & Gerday C, eds.), Berlin Heidelberg, Springer-Verlag 2008, pp. 191-209.

PUNTA, M. et al. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 2012, 40:D290–D301.

QUATRINI R, APPIA-AYME C, DENIS Y, JEDLICKI E, HOLMES D, BONNEFOY V. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. BMC Genomics 2009 10:394. doi:10.1186/1471-2164-10-394.

RAMÍREZ P, GUILIANI N, VALENZUELA L, BEARD S, JEREZ CA. Differential Protein Expression during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Iron, Sulfur Compounds, or Metal Sulfides. Applied and Environmental Microbiology. 2004;70(8):4491-4498.

RUDOLPH AS, CROWE JH, CROWE LM. Effects of three stabilizing agents-proline, betaine, and trehalose-on membrane phospholipids. Arch Biochem Biophys. 1986;245:134–143.

SAHL JW, CAPORASO JG, RASKO DA, KEIM P. The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. Wu J, ed. PeerJ. 2014;2:e332.

SAKAGUCHI H, TORMA A E, SILVER M. Microbiological oxidation of synthetic chalcocite and covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl Environ Microbiol. 1976;31:7–10.

SAND W, GEHRKE T, JOZSA PG, SCHIPPERS A. (Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect. Hydrometallurgy 2001 59(2-3):159-175.

SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014 Jul 15;30(14):2068-9.

SEPUNARU L., FRIEDMAN N, PECHT I, SHEVES M AND CAHEN D. Temperature-Dependent Solid-State Electron Transport through Bacteriorhodopsin: Experimental Evidence for Multiple Transport Paths through Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 4169–4176. [dx.doi.org/10.1021/ja2097139](https://doi.org/10.1021/ja2097139).

SHIVAJI S & PRAKASH JS. How do bacteria sense and respond to low temperature? *Arch Microbiol* 2010; 192: 85-95.

SULLIVAN MJ, PETTY NK, BEATSON SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011;27(7):1009-1010.

SWAIN MT, TSAI IJ, ASSEFA SA, NEWBOLD C, BERRIMAN M, OTTO TD. A Post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nature protocols*. 2012;7(7):1260-1284.

TALLA E, HEDRICH S, JI B, JOHNSON D, BONNEFOY V, Genome Analysis of the Psychrotolerant Acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* CF27, *Advanced Materials Research* 2013, 825, 145-148.

TAN S.N., CHEN M. Early stage adsorption behaviour of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on minerals I: an experimental approach. *Hydrometallurgy* 2012, 119–120, 87–94.

TRITT A, EISEN JA, FACCIOTTI MT, DARLING AE. An Integrated Pipeline for de Novo Assembly of Microbial Genomes. Zhu D, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e42304.

VALDÉS, J., PEDROSO I, QUATRINI R, HOLMES D, Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology, *Hydrometallurgy* 2008, 94:180-184.

WANG, Z.H., XIE, X.H., LIU, J.S., Experimental measurements of short-term adsorption of *Acidithiobacillus ferrooxidans* onto chalcopyrite. Trans. Nonferrous Met. Soc. China 2012, 22, 442-446.

ZERBINO DR, BIRNEY E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Research. 2008;18(5):821-829.

ZHANG C, ZHANG R, XIA J, ZHANG Q, NIE Z. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 2008, 18(6), 1398-1402.

ZHAO Y, WU J, YANG J, SUN S, XIAO J, YU J. PGAP: pan-genomes analysis pipeline. Bioinformatics. 2012;28(3):416-418.

IX. ANEXOS

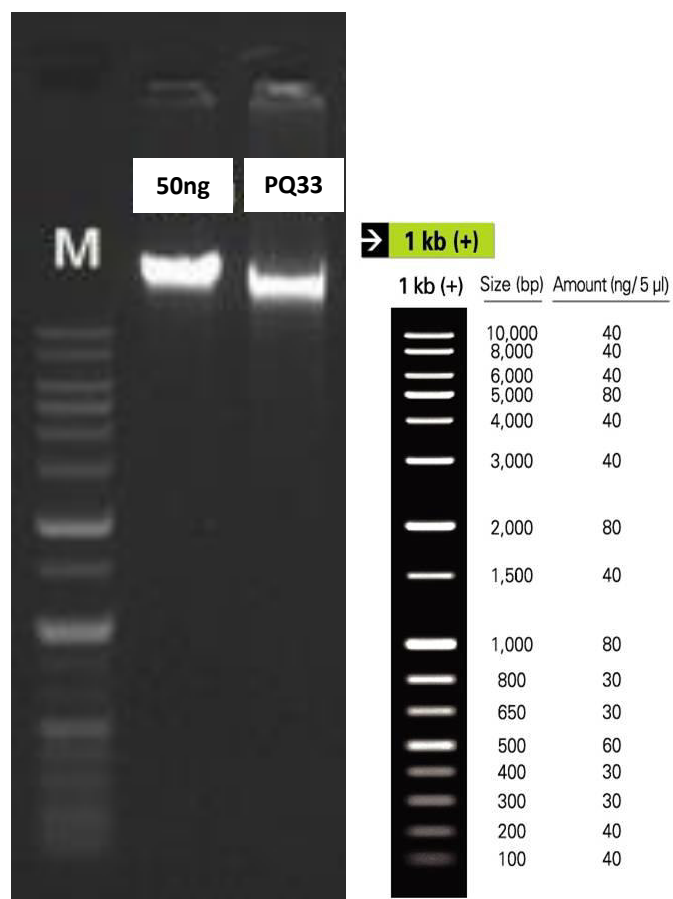


Figura S1. Integridad del DNA de *At. ferrivorans* PQ33 verificado con gel de agarosa. Imagen obtenida por Macrogen™.

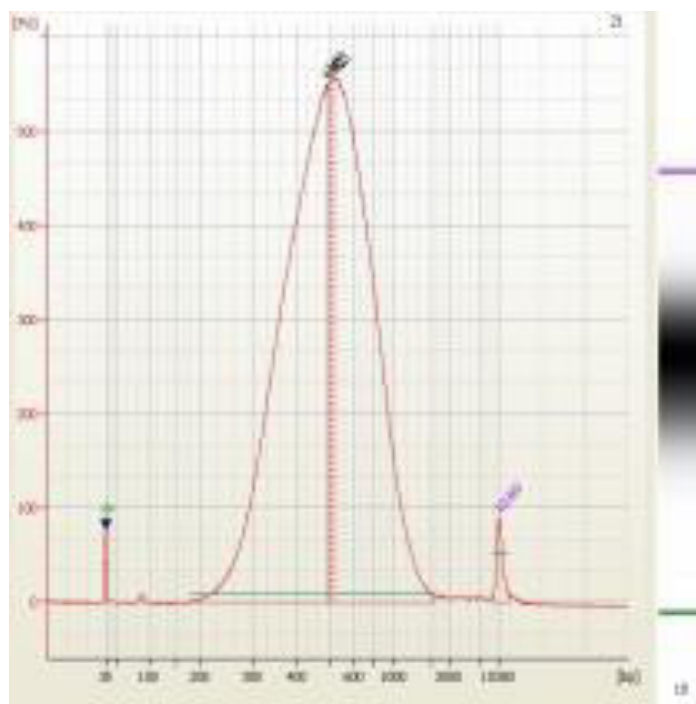


Figura S2. Calidad de la librería genómica de *At. ferrivorans* PQ33. Imagen obtenida por MacroGen™.

Tabla S1. Números de accesión de cepas de *Acidithiobacillus* sp. caracterizadas fisiológica y molecularmente en esta investigación.

<i>At. ferrivorans</i>	
PQ33	LN650696
PSB22	LN650699
PYAN12	LN650698
PQ510	LN650697
<i>At. ferrooxidans</i>	
PQ506	LN650704
PQ519	LN650706
PQ516	LN650705
PQ505	LN650703

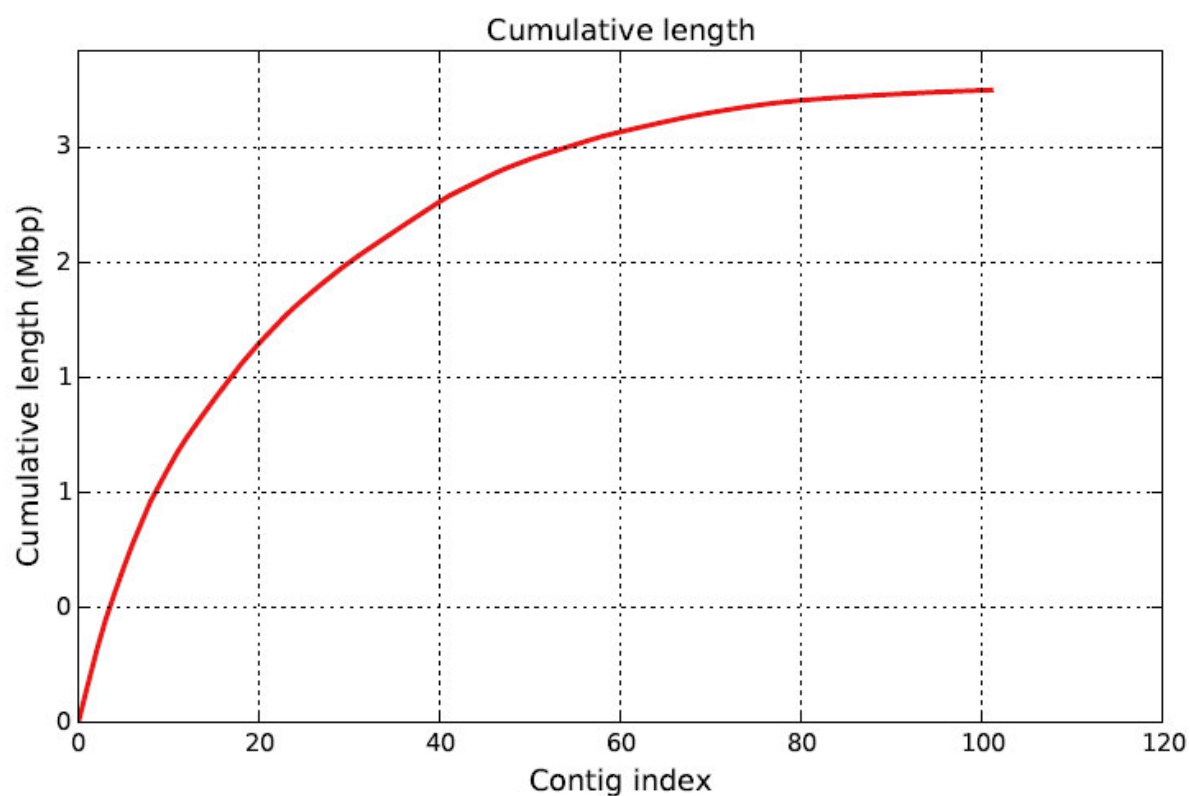


Figura S3. Longitud acumulativa de contigs de *At. ferrivorans* PQ33

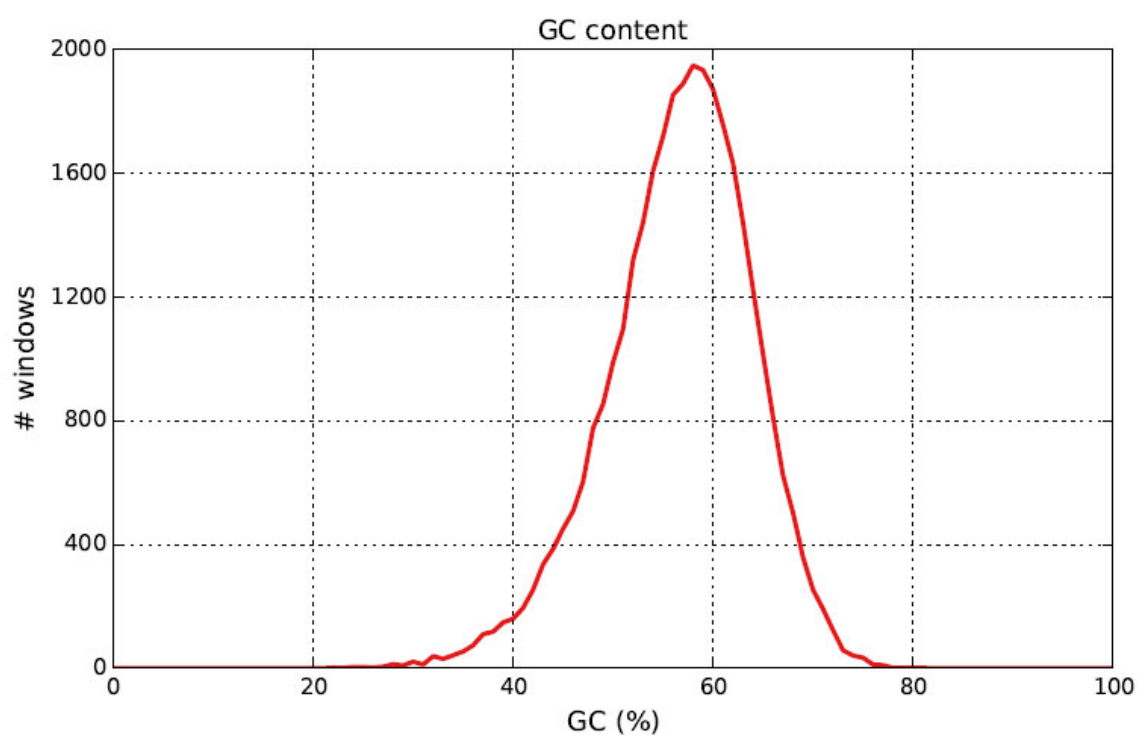


Figura S4. Cantidad de Guanina y Citosina (GC) en el genoma de *At. ferrivorans* PQ33

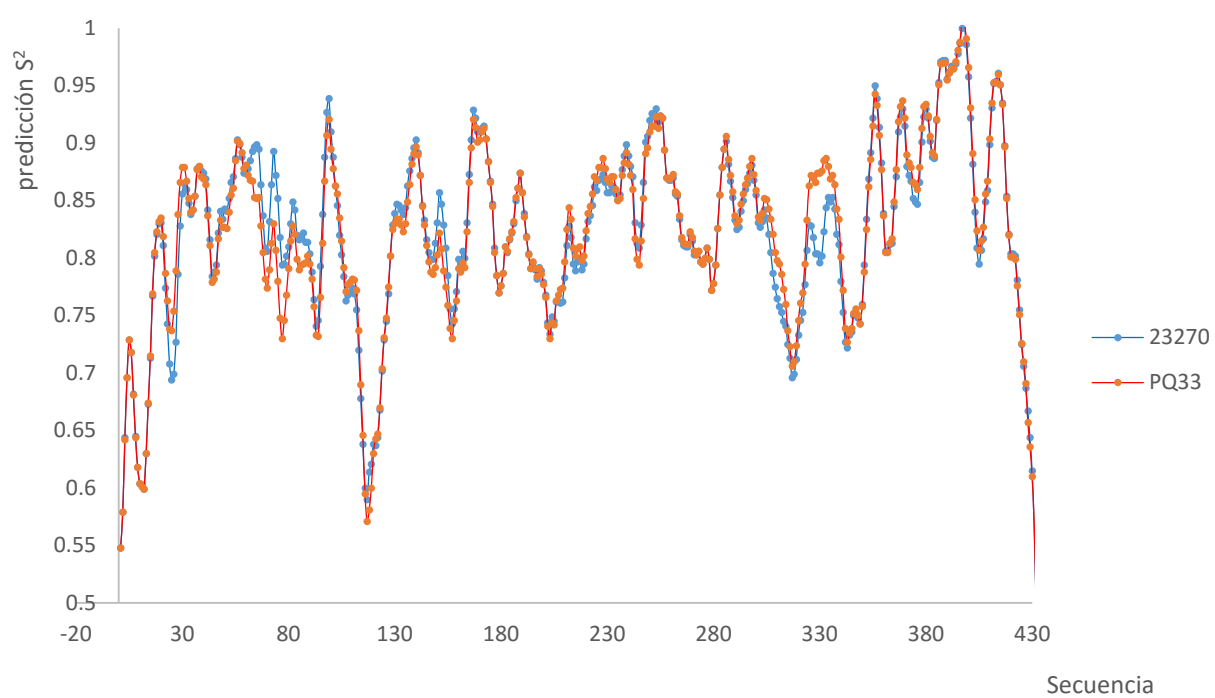


Figura S5. Flexibilidad comparativa de la enzima sulfuro quinona reductasa (sqr), encargada de la oxidación del sulfuros metálicos en *At. ferrivorans* PQ33 y *At. ferrooxidans* ATCC 23270.